Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Darstellung, Eigenschaften und enzymatischer Abbau von Chondroitinsulfat-Proteinen verschiedener Herkunft

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Kröz

aus Eßlingen/N.

1965

8191

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Herr Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Darstellung, Eigenschaften und enzymatischer Abbau von Chondroitinsulfat-Proteinen verschiedener Herkunft

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Kröz
aus Eßlingen/N.

1965

Dekan: Professor Dr. med. Schulte

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Buddecke

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Weitzel

Meinen Eltern in Dankbarkeit.

INHALT

1. Einleitung 1

1.10 Literaturübersicht 1

1.20 Problemstellung 3

1.30 Verzeichnis der Abkürzungen 4

2. Ergebnisse 5

2.10 Extraktion und chemische Zusammensetzung mucopolysaccharidhaltiger Gewebsextrakte 5

2.20 Isolierung und chemische Charakterisierung von Chondroitinsulfat-Proteinen 7

2.21 Chromatographische Reinigung 7

2.22 Chemische Analysen 11

2.23 Infrarotstudien 14

2.30 Chondroitinsulfat-Proteine als Makromoleküle 15

2.31 Verhalten in der analytischen Ultrazentrifuge 15

2.32 Bestimmung von $s^{o}_{20/w}$, $D^{o}_{20/w}$, Molekulargewicht 16

2.33 Elektronenmikroskopie 20

2.40 Änderung des Molekulargewichtes und der chemischen Zusammensetzung unter experimentellen Bedingungen 21

2.41 Kationeneinfluß 21

2.42 Enzymatischer Abbau 23

2.421 Kinetik (Lichtstreuungsmessungen) 24

2.422 Präparative Darstellung von Spaltprodukten 26

2.43 Aminosäureanalysen 29

3. Beschreibung der Versuche 31

3.10 Untersuchungsgut 31

3.20 Präparative Darstellung von Chondroitinsulfat-Proteinen 32

3.21 Extraktion mittels fraktionierten Zentrifugierens 32

3.22 Chromatographie 35

3.30 Enzymatischer Abbau von Chondroitinsulfat-Proteinen 37

3.40 Analysen 39

3.41 Chemische Bestimmungsmethoden von Stickstoff, Schwefel, Hexosamin, Uronsäure, Galaktose, Calcium 39

3.42 Physikalisch-chemische Methoden (Viskosität, Lichtstreuung, Infrarotspektrographie, analytische Ultrazentrifuge) 40

3.43 Elektronenmikroskopie 42

4. Diskussion 44

5. Zusammenfassung 50

6. Literaturverzeichnis 52

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1961 bis September 1962 im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Professor Dr. Dr. G. Weitzel bin ich für die Stellung des Arbeitsplatzes und Herrn Professor Dr. E. Buddecke für die Überlassung des Themas mit Dank verbunden.

Für die Ausführung der Sedimentations- und Diffusionsversuche mit der analytischen Ultrazentrifuge danke ich Herrn E. Lanka, Max-Planck-Institut für Biologie (Dir.: Herr Professor Dr. Friedrich-Freksa), für die Durchführung der Elektronenmikroskopie Herrn Dr. R. Speidel, Institut für angewandte Physik (Dir.: Herr Professor Dr. Möllenstedt).

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Physiologisch-chemischen Institutes bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

1. EINLEITUNG

1.10 Literaturübersicht

Hexosamin- und uronsäurehaltige Polysaccharide ("saure Mucopolysaccharide")[+] sind charakteristische Bestandteile der Extrazellulär- oder Zwischenzellsubstanz des Bindegewebes. Ihre noch wenig erforschten physiologischen Funktionen bei der Faserbildung, im Elektrolyt- und Wasserhaushalt, bei der Wundheilung u.a. haben in den letzten Jahren zu einer intensiven experimentellen Beschäftigung mit dieser Stoffklasse geführt, deren Ergebnisse in zahlreichen Monographien niedergelegt sind (1-7). Ihre Bedeutung für die Pathologie liegt in der Tatsache, daß sie an Altersveränderungen und Systemerkrankungen des Bindegewebes - u.a. auch an der Arteriosklerose - beteiligt sind (8, 9, 26).

Das Interesse an einer Erforschung der physiologischen Bedeutung der Mucopolysaccharide wurde vor allem durch ihre Reindarstellung und Konstitutionsermittlung gefördert. Besondere Bedeutung kam hierbei der Strukturaufklärung der Hyaluronsäure durch K. MEYER u. Mitarbb. (10) zu, da die erfolgreiche kombinierte Anwendung enzymatischer und chemischer Methoden Grundlage für die Konstitutionsermittlung des Chondroitinsulfat A und seiner Isomeren B und C, des Chondroitins und des Keratosulfats wurde. Untersuchungen über die Struktur des Heparins und des chemisch und biologisch verwandten Heparinmonosulfats konnten noch keine endgültige Klärung bringen (s.l.c. 7).

+) Diskussion um Nomenklaturfragen in M. Florkin u. E.H. Stotz, Comprehensive Biochemistry, Vol. 5, Carbohydrates, S. 262 ff; Elsevier Publiching Company Amsterdam, London, New York, 1963. Als Oberbegriff für die Stoffklasse der sauren Mucopolysaccharide wurde die Bezeichnung saure Glycosaminoglycane vorgeschlagen. In der vorliegenden Arbeit wird der eingeführte und in der Literatur gebräuchliche Begriff saure Mucopolysaccharide verwendet.

Bei einer systematischen Analyse der verschiedenen Bindegewebe hat sich gezeigt, daß die einzelnen Mucopolysaccharidtypen in unterschiedlicher Menge und Verteilung vorhanden sind, daß viele Bindegewebe ein charakteristisches Mucopolysaccharid-Verteilungsmuster aufweisen und insbesondere das Chondroitinsulfat im menschlichen und tierischen Organismus ubiquitär verbreitet ist. So findet sich Chondroitinsulfat bis zu 40 % des Trockengewichtes im Nasenknorpel des Rindes und in hoher Konzentration in zahlreichen anderen Knorpelgeweben (8,11), ferner in der Haut, Cornea, Sklera, Knochen und im Granulationsgewebe. Auch in der Aorta, in Sehnen, Herzklappen und in mesenchymalen Tumoren wurde sein Vorkommen beschrieben (s.l.c.6,7).

Im Hinblick auf die physiologische Funktion der sauren Mucopolysaccharide bei der Kontrolle von Diffusions- und Transportvorgängen im Extrazellulärraum war ihr Nachweis im perikapillären Gewebe vor allem in der Grundsubstanz des Kapillargrundhäutchens, ferner in der Milz und in nichtmesenchymalen Organen wie Gehirn und Niere von Bedeutung. Eine histochemische Lokalisation in der Niere ergab das Vorkommen von durch Hyaluronidase spaltbaren sauren Mucopolysacchariden im intertubulären Stroma, in den tubulären Basalmembranen und in den Hauptstückbürstensäumen (12).

Obwohl durch die genannten Ergebnisse das Problem der chemischen Struktur und der Verteilung des Chondroitinsulfats als im wesentlichen abgeschlossen betrachtet wurde, haben sich in den letzten Jahren neue Fragestellungen ergeben. Die experimentelle Erfahrung, daß eine Isolierung und Reindarstellung saurer Mucopolysaccharide erst unter Anwendung drastischer Extraktionsmethoden wie z.B. die Behandlung der Gewebe mit proteolytischen Enzymen oder die Extraktion mit stark alkalischen Lösungen, die im Prinzip schon von MÖRNER (13) und SCHMIEDEBERG (14) beschrieben wurden, führte nämlich zu der Vermutung, daß die sauren Mucopolysaccharide im Bindegewebe in ihrer nativen Zustandsform nicht als freie Polysaccharide, sondern in Bindung an Proteine bestimmter Zusammensetzung und Konfiguration vorliegen müßten. Erste Beweise für diese Annahme wurden durch die Isolierung eines Chondromucoproteins erhalten, das unter

schonenden Aufarbeitungsbedingungen gewonnen wurde und etwa 60 % Chondroitinsulfat A in kovalenter Bindung an ein Protein enthielt. Die Aminosäureanalyse des Proteinanteils konnte ausschließen, daß es sich hier um eine Kontamination mit Kollagen handelte. Durch Verbesserung des Extraktions- und Reinigungsverfahrens konnten Präparate mit einem Polysaccharidgehalt von über 80 % erhalten werden (15-17). Die Existenz von Chondroitinsulfat-Proteinkomplexen konnte auch für Rippenknorpel des Menschen (18) und der Ratte (19) sowie für menschliche Aorten (20) und für den Schädelknochen des Tigerhais (21) nachgewiesen werden. Stoffwechselversuche des Chondroitinsulfat-Proteins im Rippenknorpel der Ratte mit Doppelmarkierung des Kohlenhydrat- und Proteinanteils durch Radioisotopen (^{35}S und ^{14}C) haben darüber hinaus ergeben, daß Chondroitinsulfat-Protein auch im Stoffwechsel als eine Einheit behandelt wird (19).

Durch den Nachweis der Chondroitinsulfat-Proteine war das Problem der makromolekularen Struktur dieser Verbindungen wie Molekulargewicht, Teilchengestalt und physiko-chemische Eigenschaften zur Diskussion gestellt. Die hierzu vorliegenden Untersuchungen haben zwar ergeben, daß Chondroitinsulfat-Proteine Makromoleküle sind, deren physiko-chemische Eigenschaften grundlegend von denen des Chondroitinsulfats verschieden sind, doch führten Bestimmungen des Molekulargewichtes zu sehr unterschiedlichen oder widersprechenden Ergebnissen. So wurden z. B. für das Rindernasenknorpel-Chondroitinsulfat-Protein Molekulargewichte mit Werten zwischen $0{,}75 - 60 \times 10^6$ gefunden (22-25). Die gefundenen Differenzen wurden einerseits auf unterschiedlichen Reinheitsgrad der Präparate oder abweichende Darstellungsmethoden, andererseits aber auch auf verschiedene Meßmethoden bezogen.

1.20 Problemstellung

Untersuchungen über die funktionelle Bedeutung der Chondroitinsulfat-Proteine setzen Kenntnisse ihrer chemischen Zusammensetzung, ihres physiko-chemischen Verhaltens und ihrer Veränderung unter kontrol-

lierten experimentellen Bedingungen voraus. Eine kritische Durchsicht der Literatur führt zu der Auffassung, daß die meisten bisher gewonnenen Ergebnisse nur mit Einschränkung zu verwerten sind, da die für die Messungen eingesetzten "Mucoproteine" entweder nicht ausreichend charakterisierte Präparate waren oder bei Kenntnis der chemischen Zusammensetzung die Erfüllung der Einheitlichkeitskriterien nicht überprüft wurde.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Darstellung einheitlicher Chondroitinsulfat-Proteine aus Rindernasenknorpel, menschlichen Rippenknorpeln, menschlicher Aorta und den Versuch der Isolierung definierter Chondroitinsulfat-Proteine aus der Rinderaorta mittels spezieller Isolierungs- und Reinigungsverfahren und vergleicht sie im Hinblick auf ihre chemische Zusammensetzung, ihre physiko-chemischen Eigenschaften wie Sedimentations- und Diffusionskonstanten und weiteren molekularen Kenngrößen. Einblicke in Größe und Form von nativen Chondroitinsulfat-Proteinen werden ferner auf elektronenmikroskopischem Wege gewonnen. Weiteren Aufschluß geben Versuche über das makromolekulare Verhalten von Chondroitinsulfat-Proteinen in Gegenwart von verschiedenen Kationen sowie enzymatische Abbauversuche, die Einblick in die mögliche innermolekulare Struktur dieser Makromoleküle gewähren.

1.30 Verzeichnis der Abkürzungen

CPC	Cetyl-pyridinium-Chlorid
CSA bzw. CSA-A, CSA-B, CSA-C	Chondroitinschwefelsäure bzw. Chondroitinsulfat A, B, C
CS-Protein	Chondroitinsulfat-Protein
MA	menschliche Aorta
Mol.-Gew.	Molekulargewicht
MPS	Mucopolysaccharid(e)
MRK	menschlicher Rippenknorpel
PP-H	Polysaccharid-Protein "heavy"
PP-L	Polysaccharid-Protein "light"
PP-L^t	Polysaccharid-Protein "light", rezentrifugiert b. 100 000 x g
RA	Rinderaorta
RNK	Rindernasenknorpel

2. ERGEBNISSE

2.10 Extraktion und chemische Zusammensetzung MPS-haltiger Gewebsextrakte

Bei wäßriger Extraktion unter gleichzeitiger intensiver mechanischer Zerkleinerung lassen sich bei niedrigen Arbeitstemperaturen aus Knorpel- und Aortengewebe leichtlösliche Gewebsbestandteile in guter Ausbeute isolieren. Durch schonende Umfällung in Gegenwart von Äthanol und Kalium-Azetat sowie Abtrennung leicht sedimentierender Anteile in der Ultrazentrifuge unter Fraktionierung bei 78 000 bzw. 100 000 x g ließ sich der Gehalt an sauren Mucopolysacchariden auf etwa 60 - 80 % bei Rindernasenknorpel und menschlichem Rippenknorpel, dagegen nur auf ca. 30 % bei menschlicher Aorta und etwa 20 % bei Rinderaorta anreichern.

Tab. 1: Chemische Zusammensetzung MPS-haltiger Extrakte aus Rindernasenknorpel (RNK), menschlicher Aorta (MA) und Rinderaorta (RA) in % der eingesetzten Trockensubstanz

	Hexosamin (Galaktosamin)	Uron-säure	N	S
RNK-PP-L	21.6	22.8	5.36	3.60
RNK-PP-L'	24.7	25.1	3.9	4.2
MA -PP-L	8.55	5.22	9.36	2.84
MA -PP-L'	10.5	7.4	-	-
RA -PP-L	7.15	7.62	9.45	1.29
RA -PP-L'	-	-	11.88	-

Tabelle 1 zeigt die chemische Zusammensetzung der unter identischen Aufarbeitungsbedingungen gewonnenen mucopolysaccharidhaltigen Fraktionen PP-L und PP-L'. Die Präparate aus Rindernasenknorpel und menschlicher Aorta sind mit bereits früher beschriebenen Präparaten

identisch (17,20). Die erstmals nach dieser Methode aufgearbeitete Rinderaorta zeigt zwar äquimolare Mengen an Hexosamin und Uronsäure, läßt jedoch auf Grund des niedrigen Schwefelgehaltes nur geringe Mengen an extrahiertem CS-Protein erwarten. Beim Versuch der weiteren Anreicherung der MPS-haltigen Fraktion mit der Ultrazentrifuge bei 100 000 x g zeigte sich lediglich eine Zunahme des Stickstoffgehaltes als Ausdruck der Anreicherung einer Proteinfraktion. Außerdem zeigte sich eine mit der Zeit zunehmende Schwerlöslichkeit des Gewebsextraktes aus der Rinderaorta, so daß der Einsatz dieser Substanz für weitere Untersuchungen erschwert war und die hier angewandten Methoden der Isolierung von CS-Proteinen ohne Erfolg blieben.

Aufschlußreich sind die bei diesen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse über altersabhängige Veränderungen der chemischen Zusammensetzung bindegewebiger Strukturen. Ein Beispiel geben die Analysen der Polysaccharidproteine der einzelnen Altersklassen menschlicher Rippenknorpel (Tab. 2).

Tab. 2: Ausbeute und chemische Zusammensetzung polysaccharidproteinhaltiger Fraktionen im menschlichen Rippenknorpel verschiedener Altersklassen in % des eingesetzten Trockengewichts

Alter	Ausbeute an PP-L	Hexosamin (Galaktosamin)	Uronsäure	Neutralzucker	N	S
Neugeb.	3.2	21.2	24.1	10.88	3.75	4.12
1- 4	3.5	21.3	20.4	13.47	4.05	4.26
10-20	5.5	20.3	20.5	16.06	3.98	4.27
20-40	4.7	15.3	17.8	19.96	4.94	3.96
40-60	2.4	16.0	16.7	19.92	5.05	4.22
60-80	1.5	14.9	16.0	17.20	4.52	3.85

Der kontinuierliche altersabhängige Abfall des Galaktosamins ist auch für den nativen, integren Knorpel charakteristisch (18), so daß trotz

rückläufiger Ausbeuteergebnisse eine gleichwertige Extraktion aller leichtlöslichen Inhaltsbestandteile innerhalb der einzelnen Altersklassen angenommen werden darf. Auf Grund dessen kann auch die Verringerung des Uronsäuregehaltes mit zunehmendem Alter bei gleichzeitigem Anstieg der Neutralzucker (Galaktose) im Sinne einer altersabhängigen Verschiebung im Mengenverhältnis der sauren MPS der Interzellularsubstanz gesehen werden. Möglicherweise besteht zwischen dieser Substanz und dem nach dem vierten Lebensjahrzehnt die Hälfte aller sauren MPS in der Grundsubstanz menschlicher Rippenknorpel ausmachenden galaktosehaltigen Keratosulfat (26) ein Zusammenhang.

2.20 Isolierung und chemische Charakterisierung von CS-Proteinen

2.21 Chromatographische Reinigung

Die durch die Extraktion unter mechanischer Homogenisierung gewonnenen Polysaccharid-Proteine zeigen bei der analytischen Chromatographie an Zellulosesäulen entsprechend ihrer Herkunft charakteristisches Verhalten. Während das aus Rindernasenknorpel isolierte Polysaccharid-Protein als einheitliche Fraktion V durch Elution mit1.5 n $MgCl_2$ gewonnen wurde und lediglich CSA als Polysaccharid-Komponente enthielt, konnten die Polysaccharid-Proteine aus menschlicher Aorta und menschlichem Rippenknorpel an der Säule in mehrere Fraktionen (I, III, IV, V und VI bzw. I, V und VI) aufgetrennt werden. Abb. 1 gibt die Durchlaufkonzentrationsdiagramme für menschliche Aorta und menschlichen Rippenknorpel (10-20 Jahre) wieder. Bei der analytischen Charakterisierung ergab sich, daß lediglich Franktion V (Elution mit 1.5 n $MgCl_2$) dem CS-Protein entsprach.

Neben der in Präparaten aus Rindernasenknorpel, menschlicher Aorta und menschlichem Rippenknorpel vorgefundenen Fraktion V erscheint im Polysaccharid-Protein aus menschlichem Rippenknorpel eine sechste Fraktion, die vom völligen Fehlen beim Neugeborenen

stetig auf etwa 40 % in der Altersklasse der 60-80-jährigen ansteigt (Abb. 2).

Die Chromatographie am basischen Austauscher Dowex 1 x 2 sollte neben Verfolgung des Verhaltens des Kohlenhydrat-Anteils durch Uronsäureanalysen noch das des Proteinanteils durch UV-Messungen bei 280 nm ermöglichen. Als Modellsubstanz diente CS-Protein aus Rindernasenknorpel, das sich bereits durch die Zellulose-CPC-Chromatographie als einheitlich erwiesen hatte. Die dabei in Erscheinung tretende Aufspaltung in mehrere Fraktionen scheint jedoch nicht Ausdruck einer primären Uneinheitlichkeit zu sein, sondern auf Grund der Alkalilabilität des CS-Proteins erst während der Austauschchromatographie zu erfolgen (17, 20). Abbildung 3 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

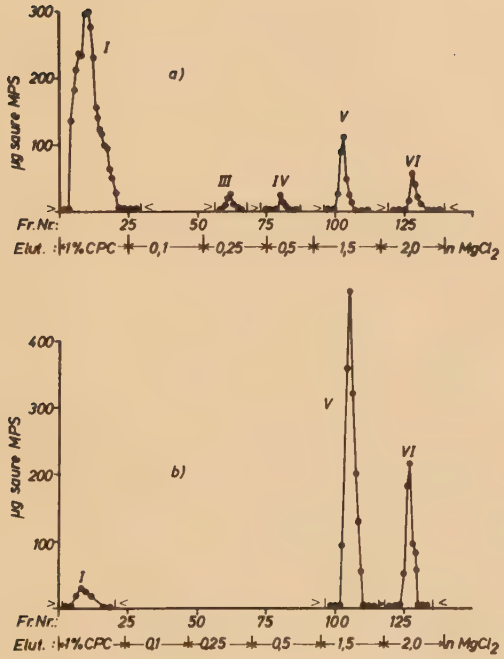

Abb. 1: a) Zellulosesäulenchromatographie von 5.25 mg PP-L[1] aus menschlicher Aorta.
Fraktion I : 1.30 mg, Fr. III 0.09 mg, Fr. IV : 0.68 mg, Fr. V : 0.37 mg und Fr. VI : 0.22 mg saure MPS, entsprechend einem Gesamtgehalt an sauren MPS von 51 %.

b) Chromatographie von 5.06 mg PP-L[1] aus menschlichem Rippenknorpel (10-20 Jahre). Fr. I : 1.08 mg, Fr. V : 1.65 mg, Fr. VI : 0.95 mg saure MPS. Gesamtgehalt an sauren MPS 72.5 %.

Säulenvolumen 15 ml; Einzelfraktionen je 1 ml Eluat. Ordinate : µg saure MPS. Fr. I wurde jeweils als Galaktose bestimmt und auf Keratosulfat umgerechnet.

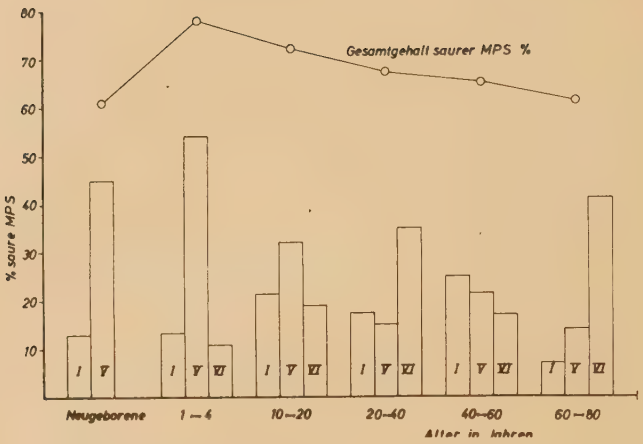

Abb. 2 : Fraktionierung von PP-L[1] aus menschlichem Rippenknorpel an der Zellulose-Säule.
Abszisse: Alter in Jahren. Ordinate: saure MPS in % der eingesetzten Trockensubstanz,
Die Fraktionen I, V und VI entsprechen denen der Abb. 1.

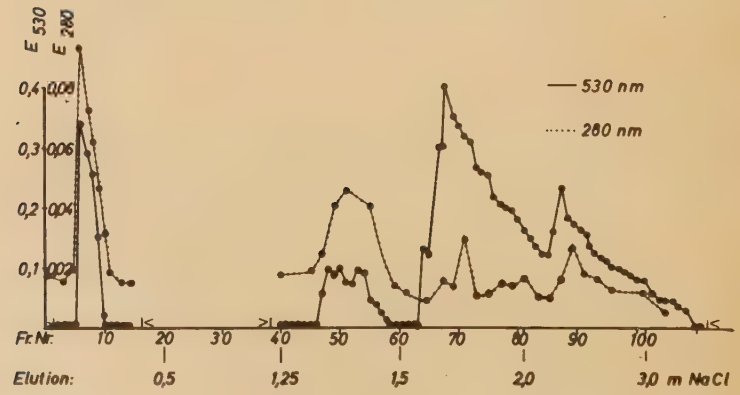

Abb. 3 : Austauschchromatographie von CPC-gereinigtem CS-Protein aus Rindernasenknorpel an Dowex 1 x 2.
Einwaage: 24.8 mg; Säulenvolumen: 40 ml.
(Methodische Einzelheiten s. Abschnitt 3.223)

2.22 Chemische Analysen

Für eine eingehende chemische und physiko-chemische Charakterisierung des CS-Proteins erwies sich die Darstellung größerer Substanzmengen als notwendig. Durch Anwendung der Chromatographie der CS-Proteinkomplexe wurden mit dem bei 3.222 angegebenen Verfahren CS-Proteine im präparativen Maßstab hergestellt. Auch die Methode nach 3.224 wurde eingesetzt, um eine größere Menge CS-Protein-Dowex- 1 x 2 aus Rindernasenknorpel zu präparieren.

Das chemisch-analytische Verhalten chromatographisch gereinigten CS-Proteins zeigt Tab. 3, in welcher auch zum Vergleich ein äußerst reines, aus kristallisiertem Kalzium-CSA hergestelltes Kalium-CSA (27) enthalten ist. Da sich das Polysaccharid-Protein aus Rindernasenknorpel bei der Zellulose-CPC-Chromatographie als einheitlich erwies, veränderten sich auch nach der Reinigung die analytischen Daten nicht erheblich, was sich in der annähernden Konstanz des Stickstoff-Hexosamin-Quotienten zeigt (R Stickstoff/Galaktosamin) = (% N/14) / (% Galaktosamin / 179), der in beiden Fällen etwa 2 beträgt. Wie die Abnahme des Stickstoff-Hexosamin-Quotienten auf 1.68 beim CS-Protein nach der Dowex-Chromatographie zeigt, ist dieses Verfahren mit einer nicht unerheblichen Entfernung von Protein verbunden und stellt demgemäß einen Eingriff in die Nativstruktur des Moleküls dar. Die Verringerung des Schwefelgehaltes gegenüber dem CPC-gereinigten Präparat ist wahrscheinlich auf den beschriebenen Verlust von Estersulfat am stark basischen Austauscher zurückzuführen (5).

Tab. 3: Chemische Zusammensetzung von CS-Proteinen aus RNK, MA und MRK in % des eingesetzten Trockengewichtes. CSA aus RNK, Kalium-Salz, als Vergleichssubstanz. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgt unter Verwendung der durch R(Stickstoff/Galaktosamin) festgelegten Protein-Anteile sowie der Mol.-Gew. 607 für das Kalium-CSA und 100 für einen Aminosäurerest.

	Hexosamin (Galaktosamin)	Uronsäure	N	S	R_{N}/ Galaktosamin	Protein (berechnet)
Kalium-CSA ($K_2C_{14}H_{19}NO_{14}S \cdot 4H_2O$)	30.5	32.0	2.48	5.6	1.04	0.6×10^{-2}
RNK-PP-L'	24.7	25.1	3.90	4.2	2.02	14.3
RNK-CS-Prot.-CPC	24.8	26.7	4.03	4.7	2.08	15.1
RNK-CS-Prot.-Dowex	24.9	27.8	3.27	4.3	1.68	10.1
MA-CS-Prot.-CPC I[1)]	22.6	25.2	4.60	4.9	2.61	21.0
MA-CS-Prot.-CPC II	21.0	26.2	4,54	-	2.76	22.5
MRK-CS-Prot.Neugeb.	28.6	23.6	3.24	-	1.45	6.9
MRK-CS-Prot. 1- 4J.	25.8	17.1	3.61	-	1.79	11.5
MRK-CS-Prot.10-10J.	29.0	22.1	3.61	-	1.59	11.3
MRK-CS-Prot.20-40J.	24.0	18.5	3.74	_	2.0	14.1
MRK-CS-Prot.20-40J.[1)]	21.1	19.2	4.31	5.1	2.5	19.8
MRK-CS-Prot.40-60J.	24.3	17.7	3.87	-	2.02	14.3
MRK-CS-Prot.60-80J.	23.8	18.7	3.64	-	1.96	13.6

1) Parallelaufarbeitung s. l.c. (27)

Alle CS-Proteine aus menschlichem Rippenknorpel sind nach Abschnitt 3.222 zellulose-CPC-chromatographisch gereinigt.

Die Analysenergebnisse der CS-Proteine aus menschlicher Aorta (II) stimmen sehr gut mit denen des bereits beschriebenen Präparates (I) (20, 27) überein. Im Gegensatz zu dem entsprechenden Präparat aus Rindernasenknorpel scheint hier weitaus mehr Protein am Aufbau des Moleküls beteiligt zu sein.

Auch aus den in Tab. 2 aufgeführten Polysaccharid-Proteinen menschlicher Rippenknorpel konnten mittels chromatographischer Trennung (s. Abschnitt 3.222) definierte CS-Proteine isoliert werden. Ihre chemische Zusammensetzung zeigt jedoch altersspezifische, charakteristische Veränderungen. Sie bestehen einerseits in einer Zunahme des Proteingehaltes, der bei 40-80-jährigen etwa das Doppelte des für Neugeborene ermittelten Wertes beträgt, zum anderen in einer Abnahme des Polysaccharidgehaltes, der sich direkt aus Hexosamin- und Uronsäureanalysen ablesen läßt.

Nach Ausweis seiner Analysen scheint ein CS-Protein aus menschlichem Rippenknorpel der Altersklasse 20-40 Jahre, aus einer Parallelaufarbeitung (27) stammend, nicht mit den übrigen CS-Proteinen aus menschlichen Rippenknorpeln übereinzustimmen. Bei verringertem Polysaccharidgehalt erweist sich vor allem der vermehrte Proteingehalt als Unterscheidungsmerkmal. Zweifellos erfährt dadurch die Aussagekraft der Analysen aller übrigen CS-Proteine aus menschlichem Rippenknorpel keine Einschränkung, zumal alle Aufarbeitungsphasen kritischer Natur (präparative Ultrazentrifuge, präparative Zellulose-CPC-Chromatographie) gleichzeitig durchlaufen wurden, so daß methodisch bedingte Abweichungen jene in gleichem Maße treffen dürften.

Mit der Isolierung chromatographisch einheitlicher CS-Proteine ergaben sich verschiedene weitere Probleme. Zunächst stellte sich die Frage, welcher Chondroitinsulfattyp bei den verschiedenen CS-Proteinen als Polysaccharid-Komponente vorhanden ist. Sodann war zu prüfen, ob es sich bei dem isolierten CS-Protein um einheitliche Makromoleküle handelt, welche physiko-chemischen Eigenschaften und molekularen Kenngrößen sie aufweisen, und inwieweit sie sich von proteinfreiem CSA unterscheiden. Zur Klärung dieser Fragen wurden die Bestimmung der optischen Aktivität, die Infrarot-Spektrographie und Sedimentations- und Diffusionsversuche mit der analytischen Ultrazentrifuge eingesetzt.

2.23 Infrarotstudien

Die Differenzierung zwischen den CSA-Isomeren A, B und C ist auf Grund charakteristischer Absorptionsbanden im Infrarot-Bereich möglich: Neben einer die ß-glykosidische Bindung (Hexuronido-ß-1,3-N-acetyl-D-galaktosamin) anzeigenden C_1-H-Deformationsschwingung von 890 cm^{-1} (3), die allen sauren MPS außer dem α-glycosidisch verknüpften Heparin zu eigen sind, können, entsprechend der axialen Konfiguration der am C_4 des Galaktosaminringes durch einen Sulfatrest ersetzten Hydroxylgruppe, CSA-A und -B durch eine Bande bei der Frequenz 850 cm^{-1} (28) von anderen MPS unterschieden werden. Die am C_6 des N-acetyl-D-hexosamins den Schwefelsäurerest tragenden MPS (CSA-C und Keratosulfat) zeigen, der äquatorialen Konfiguration der substituierten Hydroxylgruppe entsprechend, eine Absorption bei 820 cm^{-1} (28). Weiterhin weisen C_6-Sulfatester noch eine Bande bei 1000 cm^{-1} (29) auf.

Zur weiteren Klärung der Natur der Polysaccharid-Komponente wurde die spezifische optische Drehung der einzelnen CS-Protein- Präparate ermittelt.

Tabelle 4 zeigt typische Absorptionsbanden der Infrarot-Spektrogramme neben den Drehwerten chromatographisch einheitlicher CS-Proteine aus verschiedenen Bindegeweben. An Hand der Daten läßt sich nachweisen, daß es sich bei der im Rindernasenknorpel vorliegenden Polysaccharidkomponente eindeutig um CSA-A handelt. Der bereits in früheren Untersuchungen mitgeteilte Befund der ausschließlichen Anwesenheit von CSA-C im CS-Protein aus der Grundsubstanz menschlicher Aorta (20) konnte bestätigt werden. CS-Proteine aus menschlichen Rippenknorpeln scheinen dagegen keine einheitliche Polysaccharid-Komponente zu besitzen. Zusammen mit den Ergebnissen aus der Infrarot-Spektrographie könnte die optische Aktivität dieses Präparates auf das gemeinsame Vorliegen von CSA-A und -C hinweisen, jedoch sprechen Infrarot-Spektrogramm und das bestehende Uronsäuredefizit (molares Verhältnis Hexosamin/Uronsäure schwankt um 1,36)

ebenso für die Kombination von CSA-A und Keratosulfat. Dafür spricht nicht zuletzt der Ausfall der Papierchromatographie eines CS-Protein-Hydrolysates auf vorhandene Aminozucker. Neben Galaktosamin läßt sich nämlich noch eine kleinere Menge Glucosamins nachweisen, welches ja als Glucosamin-6-Sulfat im Keratosulfat gebunden vorliegt.

Die Anwesenheit von CSA-C, dessen Existenz im menschlichen Rippenknorpel als gesichert gilt (3), konnte damit nicht ausgeschlossen werden.

Tab. 4: Infrarot-Absorption und spezifische optische Drehung von Kalium-CSA-A und CS-Proteinen. Angabe der Absorptionsbanden in cm^{-1}.

$[\alpha]_D^{20}$ für CSA-A : -28^o - -32^o
für CSA-B : -60^o - -70^o (3)
für CSA-C : -12^o - -18^o

	Ring-Vibration	C_1-H-Deformation	C_4-Sulfat (axial)	C_6-Sulfat (äquatorial)	$[\alpha]_D^{20}$
Kalium-CSA-A (RNK)	925	1)	855, 840	-	-32.4
RNK-CS-Protein (CPC)	925	890	850	-	-32.5
MA -CS-Protein (CPC)	945	900	-	815, 1005	-17.5
MRK-CS-Protein (CPC)	935	1)	850	810, 1000	-23.7

1) Schwingungen nur durch kleine Banden angedeutet.

2.30 CS-Proteine als Makromoleküle

2.31 Verhalten in der analytischen Ultrazentrifuge

Bei Sedimentationsversuchen in der analytischen Ultrazentrifuge erhaltene Schlierendiagramme weisen bei Prüfung molekular-einheitlicher Substanzen nur einen einzigen, zu Versuchsbeginn schmalen, evtl. gegen Versuchsende sich an der Basis geringfügig durch Diffusion verbreiternden Gipfel auf. Wie Abb. 4 zeigt, kann dieses Einheitlichkeitskriterium bei allen geprüften Präparaten als erfüllt gelten.

Somit ist das Vorliegen mehrerer Polysaccharidkomponenten in chromatographisch einheitlichen CS-Proteinen menschlicher Rippenknorpel u. U. im Sinne einer "hybriden" Molekülbildung zu verstehen (27).

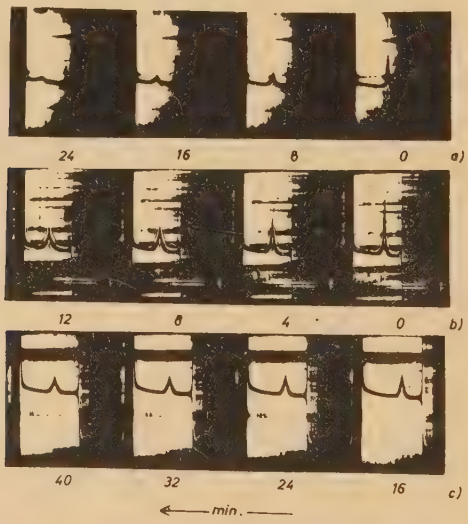

Abb. 4: Schlierendiagramme aus Sedimentationsversuchen mit CS-Proteinen aus RNK (a), MRK (b) und MA (c). 0.02 m Phosphatpuffer, pH 7.2, 59 780 Upm.

2.32 Bestimmung von $s^{o}_{20/w}$, $D^{o}_{20/w}$ und Molekulargewichten

Aus den bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelten Sedimentationskoeffizienten konnten jeweils durch Extrapolation die charakteristischen Sedimentationskonstanten bestimmt werden (Abb. 5).

Sie zeigen von $s^{o}_{20/w} = 8.93$ bei CS-Protein aus Rindernasenknorpel über $s^{o}_{20/w} = 5.87$ bei menschlichem Rippenknorpel (20-40-jährige) zu $s^{o}_{20/w} = 2.55$ bei CS-Protein aus menschlicher Aorta abnehmendes Verhalten (Tab. 5,1). Auf gleiche Weise nehmen die in gesonderten Ultrazentrifugenläufen ermittelten Diffusionskonstanten ab (Abb. 6 und Tab. 5,2). Aus diesen Werten konnten unter Benutzung des partiellen

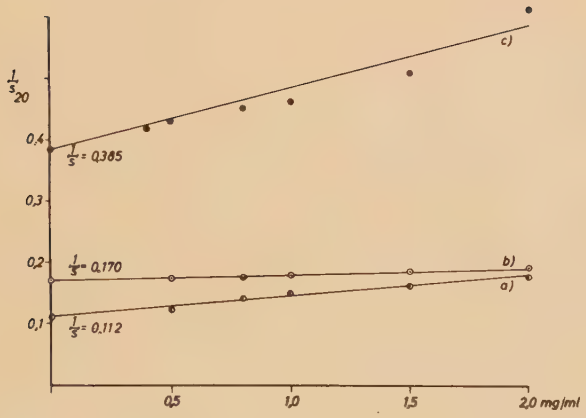

Abb. 5 : Sedimentationskoeffizienten ($1/s_{20} \times 10^{13}$ sec^{-1}) von CS-Proteinen (CPC-Fr. V) aus RNK (a), MRK (b) und MA (c) in Abhängigkeit von der Konzentration.

spezifischen Voulmens (v^+) nach SVEDBERG (30) einfache Gewichtsmittel darstellende Mol.-Gew. berechnet werden (Tab. 5,5). Kompliziertere Mittelwerte bilden die nach der Methode von FLORY und MANDELKERN (31) aus Sedimentationskonstanten und Viskosität berechneten Mol.-Gew. (Tab. 5,6). Im Rahmen der üblichen Abweichungen zeigen sie besonders mit den aus der Lichtstreuung erhaltenen Ergebnissen gute Übereinstimmung. Somit konnte gezeigt werden, daß die aus den verschiedensten bindegewebigen Strukturen rein dargestellten CS-Proteine sich nicht nur in ihrer chemischen Zusammensetzung und der Beschaffenheit der Polysaccharidanteile, sondern auch in ihren makromolekularen Eigenschaften erheblich unterscheiden.

In funktioneller Hinsicht bedeutungsvoll und wesentlich scheint ferner die Tatsache zu sein, daß alle CS-Proteine gegenüber dem proteinfreien CSA ein höheres Molekulargewicht besitzen. Besonders erwähnenswert ist der nach der chromatographischen Reinigung auftretende

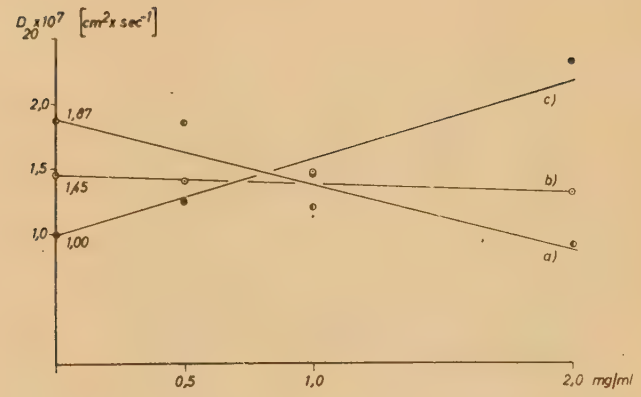

Abb. 6: Bestimmung der Diffusionskonstanten ($D^{o}_{20/w} \times 10^{-7} cm^2 sec^{-1}$) der zellulose-CPC-chromatographisch gereinigten CS-Proteine aus RNK (a), MRK (20-40-jähr.) (b) und MA (c).

Abfall des Mol.-Gew. auf etwa die Hälfte des Wertes des lediglich mehrfach an der Ultrazentrifuge fraktionierten CS-Proteins aus RNK, der sowohl durch die Ergebnisse der FLORY-MANDELKERN'schen Methode als auch der Lichtstreuungsmethode als gesichert gelten kann. Eine mögliche Deutung dieses Phänomens ist bei Abschnitt 2.41 angegeben.

Problematisch bleiben die lediglich aus Lichtstreuungsmessungen erhaltenen Mol.-Gew. der CS-Proteine menschlicher Rippenknorpel in verschiedenen Altersklassen. Daß altersabhängige chemische Veränderungen des CS-Proteins eintreten, zeigten schon die Analysendaten der Tabelle 3. Der hier gefundene kontinuierliche Abfall des Mol.-Gew. mit zunehmendem Alter der Individuen (Tab. 6) weist darauf hin, daß Alterungsprozesse auch mit makromolekularen Veränderungen einhergehen.

Tab. 5 : Makromolekulare Kenngrößen von CS-Proteinen und vergleichsweise von reinstem Kalium-CSA-A. Die Mol.-Gew. wurden nach SVEDBERG (5), nach FLORY und MANDELKERN (6) und Lichtstreuungsmessungen nach Abschnitt 3.422 (7) bestimmt.

$[\eta]$: "intrinsic viscosity", (s. l.c. 44 bzw. Abschnitt 3.421)
$\bar{v}$: partielles spezifisches Volumen (ml/g), pyknometrisch bestimmt.

	1	2	3	4	5	6	7
	$s^{o}_{20/w}{}^{x}$ $10^{-13}x$ sec^{-1}	$D^{o}_{20/w}{}^{x}$ $10^{-7}x$ $cm^{2}sec^{-1}$	$[\eta]$ $\frac{100\,ml}{g}$	$\bar{v}^{+}$ $\frac{ml}{g}$	$M_{sD}{}^{x}$ 10^{-4}	$M_{s\eta}{}^{x}$ 10^{-4}	$M_{L}{}^{x}$ 10^{-4}
Kalium-CSA-A	2.04[1]	11.3[1]	0.5	0.56	0.99[1]	2.6	2.6
RNK-PP-L[1]	10.5[2]	-	2.7	0.58	-	79[2]	85
RNK-CS-Prot.	8.93	1.87	2.1	0.58	27	55	47
MRK-CS-Prot.[3]	5.87	1.45	1.9	0.59	24	28	18
MA -CS-Prot.I[3]	2.55	1.00	1.5	0.59	15	7.1	9.5
MA -CS-Prot.II	-	-	-	-	-	-	11.0

1) Daten nach l.c. (5) bzw. unter deren Benutzung errechnet
2) " " l.c. (17) " " " " "
3) Parallelaufarbeitung, s. l.c. (27)
MRK-CS-Protein stammt aus Rippenknorpeln 20-40-jähriger

Tab. 6 : Zusammenhang zwischen Mol.-Gew. von CS-Proteinen und dem Alter der Individuen, deren Rippenknorpel zur Aufarbeitung gelangten.

Alter in Jahren	Neugeb.	1 - 4	10-20	20-40	40-60	60-80
Mol.-Gew. $\times 10^{-4}$	21	21	16	18	14	12

2.33 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Darstellung der aus Rindernasenknorpel gewonnenen - chromatographisch und in der analytischen Ultrazentrifuge einheitlichen - Makromoleküle wurde nach der Gefriertrocknung der auf einen mit Kohlefolie präparierten Objektträger aufgetropften Substratlösung vorgenommen. Auf diese Weise sollte ein Objekt ohne Artefakte präpariert werden, da bei diesem Vorgehen die bei gewöhnlicher Lufttrocknung auftretenden Oberflächenkräfte vermieden werden. Die bei 40 000-facher Vergrößerung erzielten photographischen Aufnahmen zeigt Abb. 7.

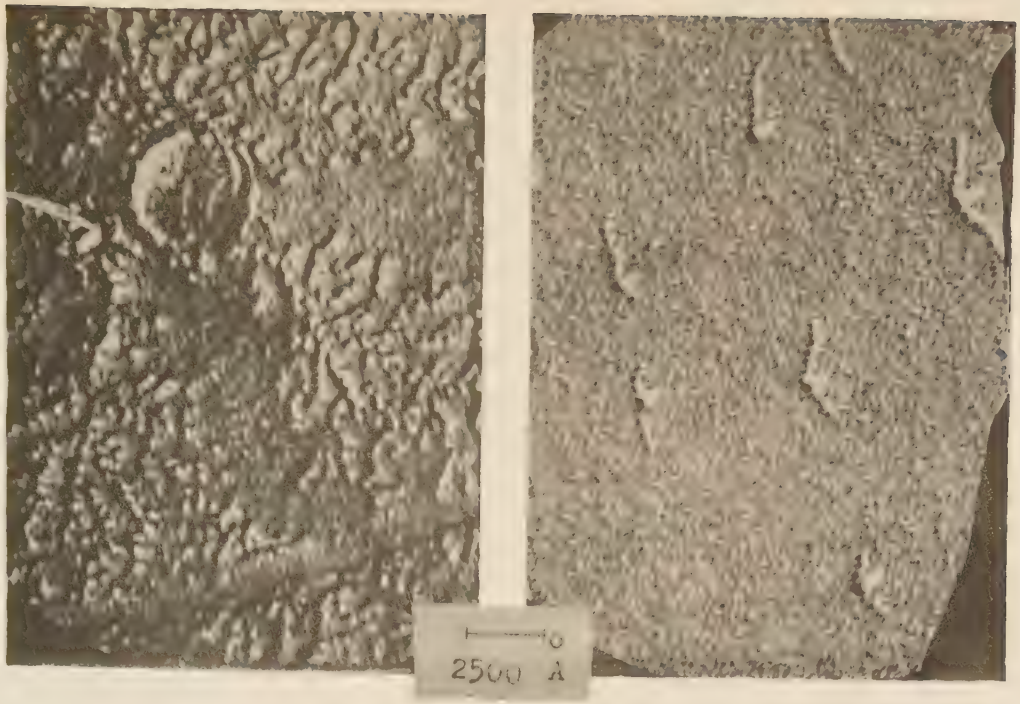

Abb. 7 : Elektronenmikroskopie von CS-Protein aus RNK (Mol.-Gew. zwischen 3 und 5 x 10^5). Platin-Iridium-Kontrastierung. Vergrößerung 40 000-fach.

Da bis jetzt noch keine vergleichbaren Aufnahmen ähnlicher Präparate vorliegen, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob es sich bei den dargestellten Partikeln um die CS-Proteine des Mol.-Gew. 3 bzw. 5×10^5 handelt oder durch die Präparation bedingte Aggregate ursprünglich dissoziierter Untereinheiten dargestellt wurden. Das globuläre β_1-Lipoprotein mit dem Mol.-Gew. von 1.3×10^6 besitzt vergleichsweise einen Moleküldurchmesser von etwa 175 Å, doch sind für die Molekülabmessungen nicht nur Mol.-Gew., sondern auch der Solvatisierungsgrad (Knäuelaufweitung durch das Lösungsmittel) von Bedeutung.

2.40 Änderung des Mol.-Gew. und der chemischen Zusammensetzung unter experimentellen Bedingungen

2.41 Kationeneinfluß

Durch mehrfache Bestimmung (analytische Ultrazentrifuge und Lichtstreuung) konnten Unterschiede im Mol.-Gew. der CS-Proteine aus Rindernasenknorpel vor und nach chromatographischer Reinigung gesichert werden. Da die Chromatographie mit Fällung des CS-Proteins durch das kationische Fällungsmittel Cetylpyridinium-Chlorid (CPC) und stufenweiser Wiederauflösung des Präcipitats mit steigenden $MgCl_2$-Konzentrationen verbunden ist, muß angenommen werden, daß diese Prozedur zur Verdrängung einer kationischen Substanz führt, die in der Lage ist, die im Nativknorpel vorliegenden Grundeinheiten der CS-Proteine zu Symplexen zu verknüpfen.

Infolge der nachgewiesenen Affinität des proteinfreien CSA gegenüber zweiwertigen Kationen, unter besonderer Bevorzugung von Ca^{2+} (32, 33), könnte demselben eine Rolle bei der Aggregation der Polysaccharid-Proteine der Grundsubstanz von Bindegewebe zugeschrieben werden, zumal sich die Stabilitätskonstanten für reines CSA-A und dessen Protein-Komplex nicht unterscheiden (33). Tatsächlich zeigen Calcium-Analysen, daß der Gehalt des Präparates mit geringerem Mol.-

Gew. mit 0.08 % wesentlich unter dem Wert liegt, den das lediglich mehrfach an der Ultrazentrifuge fraktionierte Präparat aufweist, dessen Calciumgehalt zu 0.108 % bestimmt werden konnte. Da weiterhin die Beeinflussung polarer Makromoleküle durch Ca^{2+} im Sinne einer "Übermolekülbildung" ein bekanntes und beschriebenes Phänomen darstellt (34), kann dieser Mechanismus zusammen mit dem oben angeführten zu befriedigender Klärung der bei CS-Proteinen aus Rindernasenknorpel beobachteten Erscheinung beitragen.

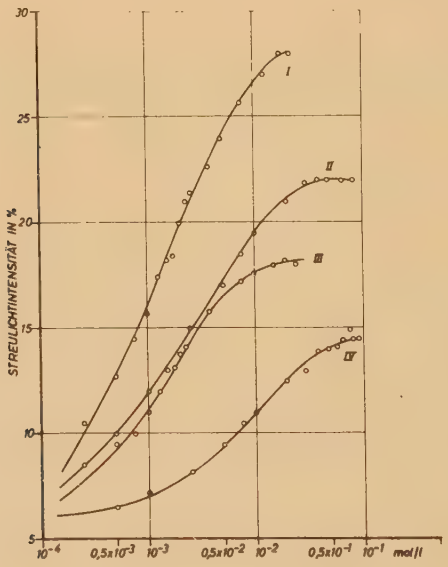

Abb. 8 : Streulichtintensität einer 0.1 proz. Lösung von CS-Protein aus RNK in Gegenwart steigender Konzentration von $CuSO_4$ (I), $CoCl_2$ (III), $CaCl_2$ (II), und NaCl (IV). Alle Lösungen wurden ultrazentrifugiert.
Ausgangswert der Streulichtintensität : 6-7 % des Trübungskeils 1113 (s. Abschnitt 3.422).
Schrittweise Zugabe der Elektrolyte (Mikrosyringe) als 0.5 bzw. 1.0 m Lösung.

In folgender Versuchsanordnung ließ sich die in Gegenwart von Kationen auftretende Aggregation direkt verfolgen: Durch Zugabe jeweils definierter Mengen 0.5 bzw. 1.0 m Salzlösung zu einer wäßrigen 0.1 proz. Lösung CPC-chromatographisch gereinigten CS-Proteins aus Rindernasenknorpel kommt es zu einer Zunahme der Streulichtintensität auf ein Vielfaches des Ausgangswertes (Abb. 8). Daß es sich hierbei nicht nur um die Auswirkung der erhöhten Ionenstärke, sondern um einen kationenspezifischen Effekt handelt, bewies die Auftragung der jeweils abgelesenen Streulichtintensitäten nicht nur gegen die molare Konzentration, sondern auch gegen die nach Zugabe der Salzlösung herrschenden Ionenstärken (o. Abb.). Besonders bemerkenswert erscheint der bei allen Elektrolyten beobachtete steile Anstieg der Streulichtintensität in einem Konzentrationsbereich von 10^{-3} bis 10^{-2} m, der unter physiologischen Bedingungen von den zweiwertigen Kationen im RNK-Frischgewebe jedoch nur vom Calcium erreicht werden kann (2.5 bis 5 x 10^{-2} m), dem somit eine Funktion bei der Aggregation und Desaggregation der interzellularen Grundsubstanz zufallen könnte.

Die Tatsache des durch NaCl-Zugabe ebenfalls hervorgerufenen Intensitätsanstiegs läßt den dargestellten Ergebnissen aber erst dann größere Bedeutung zukommen, wenn die nach Abschnitt 3.422 bestimmbaren Aggregatsgrößen - zwischen 1.1 x 10^6 nach NaCl und etwa 8 x 10^6 nach $CuSO_4$-Zugabe liegend - durch Versuche an der analytischen Ultrazentrifuge bestätigt werden können, da bekanntlich die Streulichtintensität z.B. von Albuminlösungen durch Veränderung der Ionenstärkevariiert werden kann, ohne daß sich das reelle Mol.-Gew. ändert. Vgl. hierzu l.c. (35).

2.42 Enzymatischer Abbau

Der Abbau von CS-Proteinen kann in vivo auf zwei Wegen erfolgen: Einmal ist unter Einwirkung glykosidspaltender Enzyme ein Abbau der Polysaccharidkomponente möglich, zum andern kann durch

proteolytische Spaltung des den Zusammenhalt der Kohlenhydratketten vermittelnden Proteinanteils - etwa durch die im Gewebe ubiquitär verbreiteten katheptischen Aktivitäten - eine Spaltung der CS-Proteine in kleinere Baueinheiten erfolgen.

Mittels einer neuartigen Methode (vgl. Abschnitt 3.31) wurden die Kurzzeitwirkungskurven mehrerer Enzyme an CS-Protein aus Rindernasenknorpel als Modellsubstrat aufgenommen. Ferner wurde der enzymatische Abbau im präparativen Maßstab durchgeführt, um Informationen über die bei der Digestion mit glykosidspaltenden und proteolytischen Enzymen auftretenden Veränderungen in chemisch-analytischer und makromolekularer Hinsicht zu erhalten.

Schließlich konnte durch abgestufte proteolytische Digestion Aufschluß über das Verhalten bestimmter Aminosäuren gewonnen werden, die nach früheren Angaben (36) für die Verknüpfung der Polysaccharidkette mit dem Proteinanteil verantwortlich zu machen sind.

2.421 Kinetik (Lichtstreuungsmessungen)

Die Wirksamkeit verschiedener Enzyme gegenüber dem CS-Protein aus Rindernasenknorpel läßt sich mit Hilfe der modifizierten Streulichtmethode (s. Abschnitt 3.31) besonders gut beobachten. Gegenüber dem Viskosimetertest besteht der Vorteil, daß die Ablesung kontinuierlich erfolgen kann, ohne daß der Reaktionsansatz in irgend einer Weise gestört wird oder durch zu häufige Durchlaufszeitbestimmung die Viskosität des Substrates einen Abfall erleidet (16).

Die getesteten Enzyme Hyaluronidase (50 E/ml), Enterokinase (25 γ/ml), cysteinaktiviertes Papain, Trypsin (50 γ/ml) und α-Chymotrypsin (50 γ/ml) zeigten stark unterschiedliches Verhalten (Abb. 9).

Während Enterokinase infolge seiner strengen Substratspezifität erwartungsgemäß keinen Abbau bewerkstelligte, zeigt Hyaluronidase, auch in höheren Konzentrationen (100 E/ml), einen nur geringfügigen,

linearen Abfall der Streuintensität; dagegen ergab Papain einen sehr viel stärkeren Effekt: Innerhalb von 35 min. sank die Anfangsstreuung, entsprechend einem Mol.-Gew. von 85.0 x 10^4 auf einen Wert ab, der bei der gegebenen Substratkonzentration einem Mol.-Gew. von 17.0 x 10^4 entspricht. Wesentlich schneller wird der CS-Proteinkomplex von Trypsin abgebaut, der bereits nach 2 1/2 min. Einwirkungsdauer eine Streulichtintensität aufweist, die dem Mol.-Gew. von 17.0 x 10^4 entspricht, wobei die höhere Enzymkonzentration jedoch eine Rolle spielen dürfte.

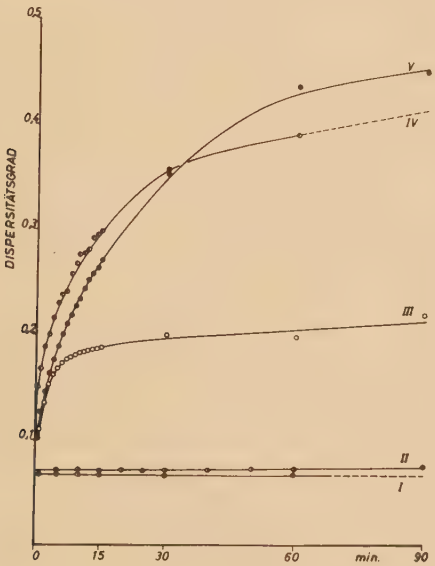

Abb. 9 : Abbauversuche im Streulicht-Photometer. Kurzzeitwirkungskurven mit Enterokinase (I), Hyaluronidase (Kinetin) (II), aktiv. Papain (III), Trypsin (IV) und alpha-Chymotrypsin (V).
Ordinate: Der Quotient c/I_s gibt hier den Dispersitätsgrad an, dem aus der angelegten Eichkurve entnommene Mol.-Gew. entsprechen (s. Abschnitt 3.422).
Abszisse: Zeit nach Zugabe des Enzyms in min.
(Jeweilige Substratkonzentration s. Abschnitt 3.31)

Zunächst etwas langsamer geht der Abbau mit α-Chymotrypsin vor sich; eine dem Mol.-Gew. von 17.0×10^4 analoge Streulichtintensität wird erst nach 6 min. Einwirkungsdauer erreicht, dafür konnte jedoch bei diesem Enzym der stärkste Abfall des Mol.-Gew. innerhalb der Beobachtungszeit registriert werden: Nach 47.5 min. Versuchsdauer konnte hier ein Abfall der Streulichtintensität auf einen dem Mol.-Gew. von 9.0×10^4 entsprechenden Wert registriert werden.

Da die entstehenden Abbauprodukte vermutlich molekulardispers sind, stellen die mitgeteilten Mol.-Gew.-Angaben nur Mittelwerte dar um welche die wirklichen Größen statistisch verteilt liegen. Jedoch genügen die erhaltenen Angaben, um die Angriffscharakteristik der eingesetzten Enzyme zu umreißen: Während die die Glykosidbindung zwischen Hexosamin und Uronsäure spaltende Hyaluronidase durch schrittweisen, langdauernden Abbau der Polysaccharidketten nur sehr langsam zu niedermolekularen Bruchstücken zu führen vermag, genügt bei den proteolytisch spaltenden Enzymen die Öffnung weniger Bindungen, um in kürzester Zeit eine starke Depression des Mol.-Gew. hervorzurufen.

Auf Grund dieser Befunde bestünde also in vivo infolge der besonderen Struktur der CS-Proteine die Möglichkeit der Depolymerisation der Grundsubstanz durch zwei verschiedene, den jeweiligen physiologischen Verhältnissen angepaßte Enzymsysteme. Über die mögliche Struktur des CS-Proteins kann auf Grund der erzielten Ergebnisse keine Aussage gemacht werden.

2.422 Präparative Darstellung von Spaltprodukten

Die in den vorangegangenen Abbauversuchen erhaltenen Aussagen über die Wirkung der geprüften Enzyme wurden durch präparative Darstellung des jeweiligen Spaltproduktes ergänzt. Die hierbei gefundenen chemisch-analytischen Unterschiede der einzelnen Abbauprodukte ermöglichen nicht nur weitere Rückschlüsse über den Wirkungsmechanismus der Enzyme, sondern geben auch Hinweise über die Art der Verknüpfung von Kohlenhydrat und Protein (Tab. 7).

Tab. 7 : Chemische Zusammensetzung und Molekülgrößen der durch enzymatischen Abbau von Polysaccharid-Protein (PP-L) aus Rindernasenknorpel gewonnenen Spaltprodukte

	Enzym	Präpariert nach	Anmerkungen	Hexosamin (Galaktosamin) %	Uronsäure %	N %	^{R}N/Galaktosamin	Proteingehalt %	M x 10^{-4}
P-L	Kinetin	3.32	1)	24.8	17.0	4.51	2.32	17.85	17.0
P-L	Kinetin	3.32	2)	21.2	19.8	4.77	2.88	23.6	8.5
P-L	Kinetin	3.32	3)	16.0	12.4	-	-	-	7.5
NK	Papain	3.35	4)	30.5	32.0	2.48	1.04	$6x10^{-3}$	2.5
P-L	Trypsin	3.34	3)+5)	26.4	21.6	2.85	1.38	5.9	5.5
P-L	Chy.-	3.33	1)	23.9	24.8	3.86	2.07	15.0	6.5
P-L	trypsin	3.33	3)	23.2	-	2.85	1.57	8.85	4.2

1) Abbauprodukt nicht CPC-gereinigt
2) Fr. I der CPC-Reinigung
3) Fr. Vder CPC-Reinigung
4) Nativer Rindernasenknorpel, der mit Papain verdaut wurde. Methodische Einzelheiten s. 1.c. (27)
5) Methodische Einzelheiten s. 1.c. (27)

Vergleicht man die Analysenergebnisse der Spaltprodukte mit denen des Ausgangsmaterials - zumeist lag Polysaccharid-Protein aus Rindernasenknorpel (PP-L) vor - so lassen sich z. T. sehr erhebliche Unterschiede erkennen. Erwartungsgemäß ist bei allen Abbauversuchen mit Kinetin ein Anstieg des Stickstoffgehaltes nachweisbar, der auf einen erhöhten Proteingehalt der Spaltprodukte hinweist. Die Digestion mit Hyaluronidase führte demnach zwar zum Zusammenbruch der primären makromolekularen Struktur, doch zeigen Hexosamin- und Uronsäuregehalt, daß nur wenig Polysaccharid zu niedermolekularen Bruchstücken abgebaut wird, die bei der Dialyse und Reinigung entfernt werden. Somit steht im Vordergrund der Hyaluronidasewirkung mehr der destruierende Einfluß auf das makromolekulare CS-Protein als die Entstehung dialysierbarer Polysaccharidspaltprodukte, wie die Bilanz der Präparation ausweist, bei welcher jeweils 80 % der eingesetzten Substanz wieder gewonnen werden konnten (vgl. Abschnitt 3.32).

Außer der sehr starken Desintegration des Makkromoleküls fällt bei den Abbauversuchen mit Trypsin und α-Chymotrypsin der Abfall des Stickstoffgehaltes und der damit verbundene Verlust des Proteinanteils auf. Offenbar werden hier nicht nur überwiegend Bindungen geöffnet, sondern es entstehen auch polysaccharidfreie Bruchstücke, die dann bei der Reinigung mit CPC nicht gefällt und beim Abzentrifugieren entfernt werden.

Mit einem Mol.-Gew. von 2.5×10^4 und einem vernachlässigbar geringen Proteingehalt erweist sich das Papainabbauprodukt als das reinste der erhaltenen Präparate, jedoch scheint dies mehr dem Umstand zu verdanken zu sein, daß zwecks Entfernung beigemengter Restproteine noch eine Behandlung am Austauscher (Dowex 50; H^+-Form) und mit Kaolin angeschlossen wurde (27). Damit stellt dieses Präparat die kleinste, unter Einhaltung schonender Aufarbeitungsbedingungen erhaltene Ketteneinheit dar.

2.43 Aminosäureanalysen

Das Ergebnis quantitativer Aminosäurebestimmung von nativem und trypsin- bzw. papainabgebautem CS-Protein aus Rindernasenknorpel ist in Tab. 8 dargestellt. Nach Ausweis des Aminosäurenspektrums handelt es sich beim Proteinanteil des nativen Komplexes um einen spezifischen Eiweißkörper; die Abwesenheit von Hydroxyprolin, das Vorliegen nur geringer Mengen von Glyzin und Prolin, sowie der höhere Tyrosingehalt sprechen gegen eine Verwandtschaft mit Kollagen oder Elastin.

Die in Glykoproteiden die Bindung zwischen Protein und Kohlenhydrat bewerkstelligenden Aminosäuren Serin, Threonin sowie Asparagin- und Glutaminsäure stellen zusammen über ein Drittel (35.6 %) aller vorkommenden Aminosäuren dar.

Der Trypsinabbau erbrachte außer dem völligen Verschwinden der Hexonbasen - die am nativen Molekül möglicherweise salzartige Bindungen eingehen können - eine Anreicherung der für die homöopolare Verknüpfung in Frage kommenden Aminosäuren Serin, Threonin, Asparaginsäure und Glutaminsäure auf zusammen 42.3 %, von denen über zwei Drittel (70 %) durch die am stärksten angereicherten Aminosäuren Serin und Glutaminsäure gebildet werden.

Trotz intensivster Reinigung konnten nach Hydrolyse des Papainabbauproduktes auf papierchromatographischem Wege noch etliche Aminosäuren nachgewiesen werden, deren direkte Bindung an das Kohlenhydrat bzw. ihre unmittelbare Nachbarschaft zu den Polysaccharidketten die Entfernung verhindert haben könnte. Unter ihnen stellte Serin mit 76 % den Hauptanteil der verbliebenen Aminosäuren dar; 8 % betrug der Anteil der Glutaminsäure. Somit kann Serin mit großer Wahrscheinlichkeit als "Brückenaminosäure" zwischen Proteinanteil und Polysaccharidkette in CS-Proteinen aus Rindernasenknorpel angesehen werden.

Tab. 8 : Aminosäurenzusammensetzung der Proteinkomponenten des nativen, CPC-chromatographisch gereinigten CS-Proteinkomplexes aus RNK und seiner durch tryptische und papainhydrolytische Spaltung gewonnenen Abbauprodukte. Die Hydrolyse erfolgte in einer Konzentration von 0,1 Proz. in 6 n HCl 24 Stdn. lang bei 110°C. Angaben in g Aminosäure/100 g Proteinkomponente. Tryptophan wird bei saurer Hydrolyse zerstört und konnte daher nicht bestimmt werden.

		nativ[1]	nach Abbau mit Trypsin[1]	nach Abbau mit Papain[2]
Hexonbasen	Arg	6.1	-	-
	Lys	2.5	-	-
	His	0.67	-	-
Mono-amino-mono-carbon säuren	Gly	6.9	10.5	-
	Ala	4.9	3.8	2.0
	Ser	6.8	11.0	76.0
	Cys	-	-	-
	Meth	0.28	-	-
	Thre	4.8	5.1	-
	Val	6.1	8.2	-
	Ileu	3.9	5.4	-
	Leu	8.0	7.8	9.0
Mono-amino--dicarbon-säuren	Asp	8.2	7.2	-
	Glu	15.8	19.1	8.0
Aromatische Amino-säuren	Phe	5.4	8.3	-
	Tyr	5.4	-	-
Iminosäuren	Pro	8.8	13.7	5.0
	Hypro	-	-	-

1) Aminosäurenanalysator Beckman, Mod. 120

2) Quantitative Papierchromatographie

3. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

3.10 Untersuchungsgut

3.11 Rindernasenknorpel

Schlachtfrisch entnommener Knorpel wurde von Schleimhaut, Perichondrium und Blut befreit, mit einem Wiegemesser in Würfel etwa der Kantenlänge 5 mm geschnitten, die Hälfte des Materials bei - 20°C eingelagert, der Rest durch Einlegen in Aceton und mehrmaligen Wechsel des Lösungsmittels entwässert.

3.12 Menschlicher Rippenknorpel

Das Material der aus jeweils ca. 8 Individuen gebildeten Altersklassen (Neugeborene, 1-4, 10-20, 20-40, 40-60 und 60-80 Jahre) entstammte dem Sektionsgut des Pathologischen Institutes der Universität Tübingen und stand als Aceton-Trockengewebe zur Verfügung. Die notwendige Vorzerkleinerung der zähen Knorpelstücke erfolgte im Star-Mix-Gerät unter Kohlensäureschnee-Kühlung (- 78°C) 3 min. lang je Charge.

3.13 Menschliche Aorta

Zur Untersuchung des Nativvorkommens des Chondroitinsulfats im Gefäßbindegewebe gelangten menschliche Aorten aus dem Sektionsgut des Pathologischen Institutes der Universität Tübingen zur Aufarbeitung. Sie wurden während der Sektion entnommen, von Adventitia und anhängendem Fettgewebe befreit und durch mehrmaliges Behandeln mit destilliertem Aceton entwässert.

3.14 Rinderaorta

Schlachtfrische Rinderaorta wurde unmittelbar nach der Entnahme im Kaltlabor bei + 3°C von Adventitia und anhängendem Fettgewebe befreit und mit einem Fleischwolf zerkleinert. Ein Teil dieses Materials wurde als Tiefkühlgut bei - 20°C eingelagert, der Rest in mehrmals erneuertem destilliertem Aceton in Trockengewebe überführt.

3.20 Präparative Darstellung von CS-Proteinen

3.21 Extraktion mittels fraktionierten Zentrifugierens

Die Aufarbeitung der Ausgangsmaterialien wurde in mehreren identischen Ansätzen durchgeführt, indem je 1 g Trockensubstanz bzw. ein entsprechender Anteil Frischgewebe mit der hundertfachen Menge auf + 3°C vorgekühlten dest. Wassers mittels eines Hochleistungs-Homogenisators unter Eis-NaCl-Kühlung 30 min. lang dispergiert wurde. Die bei Beginn der Zerkleinerung herrschende Temperatur von + 3°C stieg im Laufe des Versuchs bis auf eine Endtemperatur von etwa + 13°C an. Nach Zusatz von 1 Vol. 96 proz. Äthanol wurde durch niedertouriges Zentrifugieren der unlösliche Niederschlag (R_1) entfernt, welcher je zweimal mit Äthanol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet wurde. Der opalisierende Überstand wurde mit einem weiteren Volumen Äthanol und festem Kalium-Azetat bis zur Endkonzentration 1 % versetzt. Die entstehende Fällung wurde über Nacht bei + 3°C stehengelassen, dann abzentrifugiert und entsprechend der Viskosität des zurückbleibenden Gels in 100 bzw. 150 ml dest Wasser aufgenommen und 12 Stdn. intensiv gerührt. Die erhaltene homogene Suspension wurde in der präparativen Ulzentrifuge bei 78 000xg 1 Stunde lang unter Kühlung zentrifugiert. Der erhaltene klare Überstand wird mit 2 1/2 Volumen Äthanol und Kalium-Azetat (Endkonzentration 1 %) gefällt, abzentrifugiert, dreimal mit dest. Äthanol und

zweimal mit absolutem Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die erhaltene reinweiße Substanz wird im folgenden in Anlehnung an frühere Arbeiten als Polysaccharid-Protein "light" (PP-L) bezeichnet.

Der schwerlösliche Rückstand wird in dest. Aceton 2 min. lang homogenisiert, abzentrifugiert, mehrmals mit Aceton gewaschen und im Exsiccator über Calciumchlorid getrocknet. Diese Fraktion wird als Polysaccharid-Protein "heavy" (PP-H) bezeichnet.

Die PP-L-Fraktionen der einzelnen Extraktionsversuche gleicher Ausgangsmaterialien wurden vereinigt und in 0.6 proz. wäßriger Lösung 2 Std. bei 100 000 x g ultrazentrifugiert. Die dabei erhaltenen Fraktionen werden als PP-L^s - für den mit Äthanol und Kal.-Azetat gefällten Überstand - und PP-H^s, für den mit Äthanol und Äther gewaschenen Rückstand, bezeichnet. Die Extraktionsergebnisse einiger nach diesem Schema vorgenommenen Aufarbeitungen veranschaulicht Tab. 9.

Erwies sich schon die Präparation azetongetrockneten Rindernasenknorpels als sehr ergiebig (Tab. 9, Zeile I) in Bezug auf die Extraktion der leichtlöslichen polysaccharidhaltigen Fraktion (PP-L), so stellte doch frischer Rindernasenknorpel das Material mit der lohnendsten Ausbeute an PP-L dar (Zeile II). Beim Versuch der weiteren Fraktionierung dieser Substanz an der Ultrazentrifuge bei 100 000 x g in 0.6 proz. wäßriger Lösung konnten, wie ein Beispiel zeigt, 78 % der Einwaage des PP-L als schneeweißes, lockeres PP-L^s zurückerhalten werden (Tab. 9, Zeile III).

Als stellvertretend für die Aufarbeitungsergebnisse der sechs Altersklassen menschlicher Rippenknorpel sind die Verhältnisse in der Gruppe der 20-40-jährigen dargestellt (Tab. 9, Zeile IV). Stark altersabhängige Ausbeute an PP-L ist das hervorstechendste Merkmal dieses Aufarbeitungsprogramms: Von 3.2 % bei Neugeborenen steigt die Ausbeute auf 5.5 % bei den 10-20-jährigen an, um kontinuierlich auf 1.5 % des eingesetzten Knorpeltrockengewichts bei der Gruppe

Tab. 9 : Präparationsergebnisse von RNK, MRK, MA und RA nach Aufarbeitung mit dem oben beschriebenen Verfahren. Anstelle der röm. Ziffern sind die zugehörigen Substanzbezeichnungen aus dem Text zu entnehmen.

	Wassergehalt %	Einwaage g	R_1 g	R_1 %	PP-H g	PP-H %	PP-L g	PP-L %	PP-L' g	PP-L' %
I	5 [1]	10.0	5.5	55	1.75	17.5	2.12	21.2	-	-
II	77 [1]	130.0	11.8	34.1	10.06	29.1	12.74	36.8	-	-
III	[2]	0.88	-	-	-	-	-	-	0.70	77.9
IV	[3]	14.0	11.8	85.0	0.96	6.8	0.66	4.7		
V	[3]	56.0	45.5	87.1	6.01	11.5	0.74	1.4	-	-
VI	[2]	3.0	-	-	-	-	-	-	2.42	80.9
VII	[3]	42.0	31.3	77.5	8.9	22.0	0.22	0.5	-	-
VIII	[2]	2.88	-	-	-	-	-	-	2.45	85.2
IX	75 [1]	175.0	28.6	62.3	16.7	27.1	0.28	0.6	-	-
X	[2]	0.698	-	-	-	-	-	-	0.67	96.0

1) Gravimetrische Bestimmung

2) Vernachlässigbar gering

3) Nicht bestimmt

der 60-80-jährigen abzusinken (s. Abschnitt 2.10, Tab. 2). Bei der weiteren Fraktionierung an der Ultrazentrifuge konnte praktisch die gesamte eingesetzte Substanz als PP-L', welches zur analytischen und präparativen Chromatographie verwendet wurde, wiedergewonnen werden.

Zeile V zeigt die Ergebnisse der Aufarbeitung eines Ansatzes aceton-getrockneter menschlicher Aorta: Der Gehalt an leichtlöslicher PP-L-Fraktion hat sich bereits stark vermindert und liegt unter der Ausbeute, wie sie bei der Gruppe der 60-80-jährigen menschlichen Rippenknorpel noch erzielt werden konnte. Zeile VI gibt das Ergebnis der Rezentrifugierung bei 100 000 x g wieder.

Zeile VII und VIII enthalten die Präparationsergebnisse getrockneter Rinderaorta bzw. das Ergebnis der Rezentrifugation bei 100 000 x g. Die Zeilen IX und X veranschaulichen dasselbe für einen Aufarbeitungsgang, bei welchem frische Rinderaorta eingesetzt worden war.

3.22 Chromatographie

3.221 Analytische Säulenchromatographie

Die analytische Säulenchromatographie wurde wie 1.c (37) beschrieben vorgenommen. Je 3 bis 6 mg PP-L' werden in wenig dest. Wasser gelöst, auf eine vorbereitete 15-ml-Zellulosesäule, die sukzessive mit 2 Vol. dest. Wassers, 2 Vol. 0.1 proz. und 2 Vol. 1 proz. CPC-Lösung eluiert wurde, vorsichtig aufgetragen und nacheinander mit je 2 Vol. 1 proz. CPC-Lösung und 0.1 n, 0.25 n, 0.5 n, 1.5 n und 2.0 n $MgCl_2$, entsprechend den Fraktionen I bis VI (37), ausgewaschen. Die einzelnen Fraktionen wurden in Teströhrchen zu 1-ml-Portionen aufgefangen; die Lage der Gipfel ergab sich für Fraktion I aus der Orcinreaktion, die der restlichen Fraktionen aus der Carbazolreaktion (s. Abschnitt 3.41).

3.222 Präparative Zellulose-CPC-Chromatographie

Zur präparativen Auftrennung der meist stark heterogenen Gewebsextrakte wurden bis zu 1 g PP-L' bzw. PP-L in wäßriger Lösung in 250 ml 2.5 proz., 100 ml Naßvolumen Zellulose enthaltende CPC-Lösung langsam eingetropft, 1 Std. bei 37°C inkubiert und mit je 250 ml der den Fraktionen I bis VI entsprechenden $MgCl_2$-Konzentrationen bei Temperaturen um 26°C auf der Zentrifuge sukzessive ausgewaschen. Die jeweils erhaltenen Überstände wurden mit 3 Vol. dest. Äthanol und Zusatz von Kalium-Azetat bis zur Endkonzentration 1 % gefällt, wobei allein die Fraktion V (1.5 n $MgCl_2$) näher interessierte. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, in wenig dest. Wasser aufgenommen, 24 Std. gegen dest. Wasser dialysiert, 30 min. bei 78 000 x g ultrazentrifugiert, gefällt, mehrmals mit Äthanol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Aus 1 g PP-L aus Rindernasenknorpel konnten 0.8 g CS-Protein (CPC-Fraktion V) gewonnen werden. Auf gleiche Weise wie für das Präparat aus Rindernasenknorpel beschrieben, wurden 1200 mg PP-L' aus menschlicher Aorta chromatographisch aufgetrennt. In Fraktion I wurden 1002 mg, in Fraktion III 10 mg, in Fraktion V 45 mg und in Fraktion VI 15 mg isoliert.

Bei der Isolierung von CS-Proteinen aus menschlichem Rippenknorpel wurden 100 bzw. 200 mg PP-L' der sechs Altersgruppen zur Chromatographie mit einer der reduzierten Einwaage entsprechenden modifizierten Methode eingesetzt: In ein 50-ml-Zentrifugenglas, 25 ml 2.5 proz., 10 ml Zellulose (Naßvolumen) enthaltende CPC-Lösung fassend, wurde die in 10 ml dest. Wasser gelöste Substanz langsam zugegeben, der Ansatz sorgfältig gemischt und 1 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurde abzentrifugiert, erneut mit 2.5 proz. CPC-Lösung versetzt, wiederum zentrifugiert und die Überstände vereinigt. Sodann wurden mit je 2 x 25 ml der MgCl-Lösungen die Fraktionen II, III, IV, V und VI herausgewaschen. Die Fällung der Überstände war positiv bei den Fraktionen I, V und VI.

3.223 Analytische Chromatographie an Dowex 1 x 2

Die Chromatographie am basischen Austauscher Dowex 1 x 2, 400 meshes, wurde mit dessen Cl-Form vorgenommen. Je 10-20 mg Substanz (PP-L^1), in wenig dest. Wasser gelöst, wurden auf eine 40-ml-Säule aufgetragen, die durch Elution mit je 2 Volumen 0.5, 1.25, 1.5, 2.0, 3.0 und 4.0 m NaCl entwickelt wurde. Die Lage der Gipfel für uronsäurehaltige Fraktionen zeigte die Carbazolreaktion (42), die der proteinhaltigen die Bestimmung der Absorption von Tyrosin im UV-Spektralphotometer bei 280 nm. Testversuche mit proteinfreien Referenzsubstanzen ließen eine Zuordnung der Polysaccharidgipfel der geprüften CS-Proteine zu bestimmten Elektrolytkonzentrationen zu.

3.224 Präparative Chromatographie an Dowex 1 x 2

Zur präparativen Trennung von CS-Protein und evtl. Begleitsubstanz an Dowex 1 x 2 wurde eine 500 ml Austauscher fassende Säule mit 500 mg PP-L^1 aus Rindernasenknorpel in 0.125 proz. wäßr. Lösung beschickt und mit je 2 Säulenvol. oben im Abschnitt 3.223 angegebener Elektrolytkonzentrationen eluiert. Die Hauptgipfel für uronsäure- und proteinhaltiges Material erschienen synchron in der Fraktion II (1.25 m NaCl), jedoch lagen in der Regel auch Nebengipfel in den Fraktionen I und III, ebenfalls durch gleichzeitiges Erscheinen von Kohlenhydrat und Protein charakterssiert. So konnten, wie ein Beispiel zeigt, in den Fraktionen I 42 mg, II 68.3 mg und III 45 mg nach Fällung, Dialyse, Ultrazentrifugieren und Gefriertrocknung erhalten werden. Der Verlust betrug über 70 % der eingesetzten Substanzmenge.

3.30 Enzymatischer Abbau von CS-Proteinen

3.31 Verfolgung des enzymatischen Abbaus auf optischem Wege

Das Verhalten von CS-Proteinen aus Rindernasenknorpel gegenüber Proteasen und Testeshyaluronidase (Kinetin, Schering A.G.) konnte

auf optischem Wege mittels der Lichtstreuungsmethode verfolgt werden. Dazu wurden 2 ml einer 10/3 mg/ml Substrat enthaltenden, auf das zu testende Enzym eingestellten Pufferlösung mit dem gleichen Volumen einer 50 bzw. 100 γ/ml enthaltenden Enzympufferlösung in die 6-ml-Küvette pipettiert, die im betriebswarmen Eppendorf-Photometer auf ca. 30°C temperiert war. Beide Lösungen waren vor der Vereinigung 15 min. lang bei 100 000 x g entstaubt worden. Die zugesetzte Enzymmenge war so gewählt, daß sie die Anfangsstreuung der Substratlösung nicht beeinflußte. Lediglich bei den Versuchen mit Hyaluronidase machte sich das zugefügte Enzym störend bemerkbar, so daß hier zur Ausschaltung dieses Effekts die Substratkonzentration auf 5 mg/ml erhöht und das Enzym direkt aus der Ampulle (150 E) zugegeben wurde. Da 150 E ca. 300 γ wiegen, war die Enzymkonzentration bei 3 ml Küvetteninhalt ca. 100 γ /ml. In der Regel erfolgte die erste Messung 30 sec. nach Durchmischung des Ansatzes, die letzte etwa 1 1/2 Std. nach Beginn der Reaktion.

3.32 Präparativer Hyaluronidase-Abbau

1 g PP-L[1] aus acetongetrocknetem Rindernasenknorpel wurde in 50 ml Azetatpuffer, pH 6, gelöst und mit 450 E Testeshyaluronidase (Kinetin, Schering A.G.) 36 Std. im geschlossenen Gefäß bei 37°C unter Zusatz eines Tropfens Toluol inkubiert, sodann erneut 450 E Enzym zugegeben und weitere 36 Std. abgebaut. Nach 24-stündiger Dialyse gegen dest. Wasser bei +3°C Fällung mit 3 Vol. Äthanol und Kalium-Azetat (Endkonzentration 1 %). Nach Waschen mit Alkohol und Äther und Trocknung im Vakuum verblieben 836 mg Abbauprodukt, wovon 250 mg, in dest. Wasser gelöst, mit 20 ml 2.5 proz. CPC-Lösung versetzt wurden. Der gefällte Überstand erbrachte 152 mg, die Lösung des entstandenen Niederschlages in 1.5 n $MgCl_2$ ergab nach Dialyse 45 mg (Fr. V).

3.33 Präparativer α-Chymotrypsin-Abbau

500 mg PP-L[1] aus frischem Rindernasenknorpel wurden in 25 ml Phosphatpuffer bei pH 8 mit 10 mg α-Chymotrypsin (Boehringer, Mannheim) bei 37°C 12 Std. inkubiert und anschließend 24 Std. bei +3°C gegen dest. Wasser dialysiert. Nach Fällung und Trocknung verblieben 317 mg. Davon wurden 200 mg in 10 ml dest. Wasser gelöst und 10 ml 2,5 proz. CPC-Lösung zugegeben. Nach Abzentrifugieren der Fällung wurde sofort mit 1,5 n $MgCl_2$ versetzt und der Rückstand vollkommen aufgelöst; nach der Fällung mit Äthanol und Kalium-Azetat konnten 75 mg als Fraktion V isoliert werden.

3.34 Trypsin-Abbau nach l.c. (27)

3.35 Papain-Abbau nach l.c. (27)

3.40 Analysen

3.41 Chemische Bestimmungsmethoden von Stickstoff, Schwefel, Hexosamin, Uronsäure, Galaktose und Calcium

3.411 Stickstoff: Veraschung der Analysensubstanz mit konz. Schwefelsäure und Kaliumpermanganat (38) und Bestimmung des Stickstoffs nach einer modifizierten Mikrokjeldahl-Methode (39).

3.412 Schwefel: Verbrennung von 10-15 mg Substanz in Sauerstoffatmosphäre (40) und anschließend konduktometrische Titration des entstandenen SO_4^{2-} mit $BaCl_2$.

3.413 Hexosamin: Nach Hydrolyse mit 6 n HCl, 4 Std. lang bei 100°C in geschlossenen Hydrolysenkölbchen, Kolorimetrie nach l.c. (41).

3.414 Uronsäure: Nach Hydrolyse und Farbreaktion nach DISCHE (42) Kolorimetrie bei 530 nm und Vergleich der erhaltenen Werte mit einer gleichzeitig angefertigten Eichkurve.

3.415 Galaktose: Hydrolyse und Farbreaktion nach l.c. (43).

3.416 Calcium: Die Calciumbestimmung erfolgte durch Titration einer Lösung der zu untersuchenden Substanz in alkalischem Milieu mit Komplexon.

3.42 Physikalisch-chemische Methoden

3.421 Viskositätsmessungen

Zur Berechnung der Mol.-Gew. nach der FLORY-MANDELKERN'schen Methode für CS-Proteine und des proteinfreien Kalium-CSA war die Bestimmung der Viskosität erforderlich. Angegeben wird die sogen. "intrinsic viscosity", der gegen die Konzentration O extrapolierte Grenzwert der bei verschiedenen Konzentrationen im Ostwald'schen Viskosimeterröhrchen bei 25°C ermittelten "reduzierten Viskositäten" (44).

3.422 Lichtstreuung

Lichtstreuungsmessungen zur Mol.-Gew.-Bestimmung erfolgten in einem Eppendorf-Photometer, das mit einer Zusatzausrüstung versehen war, bei Wellenlängen zwischen 400 und 600 nm, unter einem Beobachtungswinkel von 90°. Als Vergleichssubstanzen fanden Polyvinylpyrrolidone der B A S F -Kollidon 17 und 25, sowie Luviskol K 30 - und Serumalbumin und gamma-Globulin vom Rind (Beringwerke) Verwendung.

Die Brechungsinkremente von PVP mit 0.175 (45), sowie Albumin mit 0.186 (35) und γ-Globulin mit 0.188 (35) liegen ungefähr in der Größenordnung des Brechungsinkrements 0.17 (25) für CS-Proteine. Sofern die Größe der zu untersuchenden Partikel im Raleigh-Bereich, d.h. unter 1/20 der Wellenlänge des verwendeten Lichtes, bleibt, ist keine assymmetrische Streuung anzunehmen, so daß die Gleichung $1/M = H \times c/J_s$ (35) infolge der Konstanz der in H enthaltenen Größen: Brechungsindex des verwendeten Lösungsmittels, Brechungsinkrement der eingesetzten Substanzen und Wellenlänge des verwendeten

Lichtes, auf die Proportionalitätsbeziehung 1/M prop. c/J_s reduziert und damit zur Aufstellung einer Eichkurve benutzt werden kann, sofern Vergleichssubstanzen von bekanntem Mol.-Gew. zur Verfügung stehen.

Verfahren: Von der zu messenden Substanz werden in Azetatpuffer pH 6, Ionenstärke 0.15 (0.1 n $Na(CH_3O_2)$ + 0.05 n NaCl), Stammlösungen der Konzentration 6.0 mg/ml bei zu erwartenden niedrigen, 3.0 mg/ml bei hohen Mol.-Gew. hergestellt. Je 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 und 6.0 ml dieser Lösungen werden mit trockenen, äußerst sorgfältig gereinigten Pipetten in die ebenso sauberen Zelluloseazetatröhrchen des 40.2-Rotors der Ultrazentrifuge (Spinco-Modell E) gebracht, mit Azetatpuffer auf 6.0 ml aufgefüllt, gut verschlossen und die Lösungen ausgiebig vermischt. "Entstaubt" wurden die Lösungen durch 20-minütiges Ultrazentrifugieren bei 100 000 x g. Unter Vermeidung der Wiederaufwirbelung etwaig sedimentierter grobdisperser Partikel und Mikrogele wurden die Lösungen in aufsteigender Konzentration in eine 6-ml-Messküvette dekantiert. Zur Messung war in der Regel ein Volumen von 4 ml ausreichend. Nach Abzug der Eigenstreuung des Puffers und der Küvette wurden die Streuintensitäten in % des Trübungskeiles 1113 gegen die Konzentration aufgetragen. Die Meßpunkte liegen in statistischer Verteilung um eine durch den Ursprung gehende Gerade.

Diese Methode erhebt keinen Anspruch auf völlige Exaktheit der ermittelten Ergebnisse, hat sich jedoch, gestützt durch die Versuche mit der analytischen Ultrazentrifuge, zur ungefähren Ermittlung von Mol.-Gew. bis zur Größenordnung $0.8 - 0.9 \times 10^6$ hinreichend bewährt.

Der Kationeneinfluß auf CS-Proteine wurde am Modell des CS-Proteins aus Rindernasenknorpel geprüft. Dazu wurden zu 4 ml einer 1 mg/ml CS-Protein enthaltenden wäßr. Lösung aus einer Agla-Mikro-Syringe schrittweise Lösungen von 0.5 bzw. 1.0 m $CuSO_4$, $CoCl_2$ und NaCl zugegeben, vorsichtig gemischt und nach Beruhigung des Systems die

Streuintensitätszunahme gemessen, die in einem Koordinatensystem gegen die nach der Elektrolytzugabe herrschende molare Konzentration aufgetragen wurde.

3.423 Infrarotspektrographie

Da die meisten proteinfreien sauren MPS in hochgereinigter Form zur Verfügung standen, konnte die Identität der Polysaccharidkomponenten der CS-Proteine auf dem Wege des Vergleichs mit den Absorptionsbanden dieser Referenzsubstanzen ermittelt werden. Als Präparationsmethode fand die Kalium-Bromid-Preßtechnik (46) Verwendung, die gegenüber den anderen gebräuchlichen Methoden außer dem Vorteil des geringen Substanzbedarfes - 0.5 bis 1 mg Substanz pro Preßling sind erforderlich - noch den Vorzug der unkomplizierten Auswertung der Spektrogramme infolge des Wegfalls von Eigenabsorptionen des Kalium-Bromids im Infrarot-Bereich besitzt.

3.424 Analytische Ultrazentrifuge

Die zur Bestimmung des Mol.-Gew. nach SVEDBERG (30) bzw. nach FLORY-MANDELKERN (31) erforderlichen Sedimentations- und Diffusionsmessungen wurden in der analytischen Ultrazentrifuge (Spinco-Modell E) bei 20°C in 0.02 m Phosphatpuffer pH 7.2 durchgeführt; photographische Registrierung der Schlierendiagramme zur Ermittlung der Sedimentationskonstanten erfolgte in Abständen von 4 bzw. 8 min. über einen Zeitraum von 1 bis 1 1/2 Std. hinweg bei je 6 verschiedenen Konzentrationen und einer Drehzahl von 59 780 Upm (Überschichtungszelle, "valve type"). Zur Ermittlung der Diffusionskonstanten wurden mit einer Überschichtungszelle vom "capillary type" gesonderte Läufe bei 8 - 9 000 Upm und je 3 verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.

3.43 Elektronenmikroskopie

Ein auf eine Kohle-Trägerfolie aufgebrachter Tropfen einer 10^{-5} proz. Lösung chromatographisch gereinigten CS-Proteins aus Rinder-

nasenknorpel wurde bei -180°C im Hochvakuum eingedampft und mit Platin-Iridium-Legierung im Vakuum kontrastiert. Von dem auf diese Weise präparierten Objekt wurden bei 40 000-facher Vergrößerung photographische Aufnahmen angefertigt.

4. DISKUSSION

Polysaccharidproteine als native Zustandsform der Chondroitinsulfate konnten zwar aus Rippen- (18), Schädel- (21) und Nasenknorpel (15, 17, 22, 23, 24) isoliert werden, doch zeigten die makromolekularen Eigenschaften gerade der aus den beiden zuletzt genannten bindegewebigen Strukturen gewonnenen Mucoproteine starke Abhängigkeit von den jeweiligen Präparationsmethoden, während sie sich in ihren chemisch-analytischen Eigenschaften nur sehr wenig unterschieden. Erst der Isolierung von CS-Protein aus menschlicher Aorta (20) blieb es vorbehalten, mittels spezieller Methoden ein chromatographisch und in der analytischen Ultrazentrifuge einheitliches Präparat darzustellen. Der Einsatz dieser Methode führte nun bei Rindernasenknorpel, menschlichem Rippenknorpel verschiedener Altersgruppen und menschlicher Aorta wiederum zu einheitlichen Präparaten, die sich bezüglich des Typs des erhaltenen Chondroitinsulfats, der chemischen Zusammensetzung und des makromolekularen Verhaltens in charakteristischer Weise unterscheiden.

Als Polysaccharidanteile konnten beim Nasenknorpel CSA-A und CSA-C in CS-Proteinen aus menschlicher Aorta mittels Infrarotspektrographie und Bestimmung der optischen Aktivität ermittelt werden, ohne daß durch die Anwesenheit der Proteinkomponente die Ergebnisse beeinflußt werden konnten. Optische Aktivität und Infrarot-Analysen weisen bei den CS-Proteinen aus menschlichen Rippenknorpeln neben dem Vorliegen von CSA-A auch auf die Anwesenheit von CSA-C hin, so daß entweder die Existenz eines "hybriden Moleküls" oder das Vorliegen zweier gleichgroßer, entweder CSA-A oder C enthaltender, Polysaccharid-Proteinkomplexe angenommen werden kann. Jedoch ist auf Grund des bestehenden Uronsäuredefizits - ohne altersabhängigen Zusammenhang zwischen 5 und 8 % liegend - und des

papierchromatographischen Nachweises von Glucosamin auch eine Beteiligung von Keratosulfat am Aufbau des Moleküls schlüssig, welches sich chromatographisch und in der analytischen Ultrazentrifuge als einheitlich erwiesen hat.

Mit Hilfe des Stickstoff-Hexosamin-Quotienten konnte der Proteingehalt des PP-L'-Präparates aus Rindernasenknorpel zu 14.3 % berechnet werden und liegt damit um 3 % niedriger als ein mit der Biuretmethode erzieltes Ergebnis am selben Präparat (27). Für das mit der Zellulose-CPC-Chromatographie gereinigte CS-Protein betrug der errechnete Wert 15.1 % und stimmt mit dem experimentell gefundenen (16 % (27)) gut überein. Einen möglichen Eingriff in die Nativstruktur des Moleküls bedeutet die chromatographische Reinigung am basischen Austauscher Dowex 1 x 2, die außer dem Abfall des Proteingehaltes auf 10 % noch einen Verlust an Estersulfat um ca. 8.5 % gegenüber dem mit der CPC-Methode gewonnenen Präparat zur Folge hatte.

Physiologische Alterungsvorgänge im Rippenknorpel des Menschen scheinen sich nicht nur in einer allgemeinen Vermehrung des Stickstoffgehaltes auf Kosten hexosaminhaltiger Substanzen auszudrücken (18), sondern neben dem anteilmäßigen Anwachsen, nach Ausweis des chemischen Verhaltens (Chromatographie, Analyse und Infrarot-Spektrographie der Fraktionen I und VI) stark keratosulfathaltiger Substanzen charakteristische Veränderungen in chemischer Zusammensetzung und makromolekularer Struktur zu zeitigen; Mit einer Zunahme des Proteingehaltes von 7 % bei Neugeborenen auf etwa 14 % bei der Gruppe der 40-80-jährigen (im Falle der Parallelaufarbeitung einer Gruppe 20-40-jähriger waren es allerdings 19.8 %) ist ein Abfall des Mol.-Gew., legt man die Lichtstreuungsmessungen zugrunde von 210 000 auf 120 000 verbunden. Da kürzlich mittels autoradiographischer Untersuchungen gezeigt wurde, daß das gesamte Mesenchym von gleichgearteten Alterungsvorgängen (47, 48) betroffen ist, besteht auf Grund obiger Ergebnisse die Möglichkeit, der Veränderung der Diffusions- und Permeabilitätsverhältnisse in der Grund-

substanz mit zunehmender Individualalterung zum einen eine Verschiebung des Mengenverhältnisses der interstitielle Räume erfüllenden sauren MPS, zum andern die tiefgreifende Änderung der makromolekularen Eigenschaften der in der Grundsubstanz normalerweise dominierenden CS-Proteine zuzuordnen.

CS-Proteine aus menschlicher Aorta erwiesen sich mit über 20 % Proteingehalt als die eiweißreichsten aller isolierten Polysaccharid-Proteine; da sich die aufgearbeiteten Organe überwiegend aus der Altersklasse 40-60 Jahre zusammensetzten, wäre zu prüfen, ob die Aorta denselben Gesetzmäßigkeiten unterliegt, wie sie hinreichend für die Verhältnisse im menschlichen Rippenknorpel umrissen werden konnten.

Die chromatographische Darstellung der CS-Proteine führte zu molekulareinheitlichen Substanzen, deren Mol.-Gew., aus Sedimentations- und Diffusionskonstanten bzw. aus Sedimentationskonstanten und Viskositätsmessungen errechnet, im Rahmen der üblichen Abweichungen mit den aus der Lichtstreuung erhaltenen Größen übereinstimmen. Der ermittelte Wert des Präparates aus Rindernasenknorpel liegt jedoch mit 5×10^5 weit niedriger, als für ähnliche Präparate angegebene Größenordnungen von $1-40 \times 10^6$ (22, 24, 25) darlegten. Unter Benutzung der an einem lediglich mit der Ultrazentrifuge fraktionierten Präparat (17) ermittelten Sedimentationskonstanten konnte nach FLORY-MANDELKERN ein Mol.-Gew. von $7,9 \times 10^5$ errechnet werden, dem das bei Lichtstreuungsmessungen bestimmte von $8,5 \times 10^5$ des identischen PP-L' sehr gut entsprach. Damit dürfte mit 5×10^5 die derzeit kleinste Einheit des Chondroitinsulfat-Proteins aus Rindernasenknorpel vorliegen. Die Neigung zu Komplexbildung und Aggregation erklärt die beschriebenen unterschiedlichen Mol.-Gew.

Zum erstenmal werden im Rahmen dieser Arbeit Molekulargewichte von CS-Proteinen aus menschlichem Rippenknorpel mitgeteilt. Nach Ausweis aller Berechnungen und Bestimmungen liegen dort Mol.-Gew. zwischen 1,2 und $2,8 \times 10^5$ vor, die den Ergebnissen der

Lichtstreuung zufolge noch altersabhängige gesetzmäßige Verteilung zeigen dürften (s.o.).

Molekulargewichte zwischen 7 und 11 x 10^5 für CS-Proteine aus menschlicher Aorta sind zwar kleiner als die aus den übrigen Organen isolierten, liegen jedoch beträchtlich höher als vorangegangene Untersuchungen (20) angegeben hatten.

Die erweiterte EINSTEIN'sche Formel (49), log D = 0.33 log M - 4.49, stellt zwischen dem Mol.-Gew. und der zugehörigen Diffusionskonstante eine lineare Beziehung her, sofern die untersuchten Partikel Kugelform aufweisen. Unter Zugrundelegung der nach SVEDBERG bestimmten Mol.-Gew. weichen jedoch alle untersuchten CS-Proteine einschließlich der proteinfreien Kalium-CSA-A von der Kugelform ab, indem die experimentell ermittelten Diffusionskonstanten in der Reihenfolge Kalium-CSA-A, RNK, MRK- und MA-CS-Protein zunehmende Abweichung von den mit der EINSTEIN'schen Gleichung errechneten Konstanten aufweisen. So betragen die errechneten Diffusionskonstanten für das CS-Protein aus Rindernasenknorpel D_E = 4.43 gegenüber einer experimentell ermittelten Konstante von 1.87 , D_E = 6.34 gegenüber einer experimentellen Konstante von 1.00 beim CS-Protein aus menschlicher Aorta. Die daraus gefolgerte gestreckte Molekülgestalt deutet zwar auf Grund der Ergebnisse von Lichtstreuungsmessungen (22) auf eine stäbchenförmige Struktur der Moleküle mit einem Achsenverhältnis von 1 : 100 hin, jedoch würde nach ähnlichen Messungen auch ein polydisperses System "statistischer Knäuel" als mögliche Struktur in Frage kommen (25). Für letztere Version sprechen an und für sich die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie (s. Abschnitt 2.33, Abb. 7), die allerdings die gemeinhin für statistische Knäuel vorgeschlagene Form "bohnenförmiger Ellipsoide" (50) nicht erkennen lassen.

Chemische Zusammensetzung und makromolekulares Verhalten mittels verschiedener Enzyme gewonnener Spaltprodukte lassen bezüglich der innermolekularen Struktur einige bedeutsame Schlüsse zu.

Im Verein mit den chemisch-analytischen Eigenschaften und der Größe der mit Testeshyaluronidase entstandenen Bruchstücke gewinnt die vorgeschlagene End-zu-End-Verknüpfung der Polysaccharid-Einheiten mit niedrigermolekularen Peptiden (23) sehr an Wahrscheinlichkeit. Die Testeshyaluronidase als typisches Endo-Enzym verliert nach Heraustrennung einiger Tetrasaccharide offenkundig sehr schnell an Affinität gegenüber dem verbleibenden Polysaccharid-Protein, wie dessen hoher Gehalt an Hexosamin und Uronsäure selbst nach dreitägigem Abbau ausweist, führt dabei jedoch einen Zusammenbruch des Riesenmoleküls in Bruchstücke der Größenordnung $17.0 - 6.5 \times 10^4$ herbei.

Nach Abbau des CS-Proteins aus Rindernasenknorpel mit Papain konnten im gereinigten Kalium-CSA-A zu über 70 % der noch vorhandenen Aminosäuren als Serin erkannt werden, das in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen als Brückenaminosäure zwischen Protein- bzw. Peptidanteil und Chondroitinsulfat-Komponente bezeichnet werden kann. Die Verknüpfung des Serin-Hydroxyls mit CSA kann entweder in Form eines Schwefelsäure-di-esters oder als Carbonsäureester mit der Carboxylgruppe einer Uronsäure erfolgen. Das Vorliegen eines Serin-Schwefelsäureäthers als Bindungsmodus kommt natürlich auch in Betracht, wenn dieser auch infolge der Alkalilabilität des CS-Proteins unwahrscheinlicher sein dürfte als die beiden anderen vorgeschlagenen Möglichkeiten. Das vielfach beobachtete Sulfatdefizit des CSA nach alkalischer Extraktion aus seiner Nativstruktur (s. Übersicht bei l.c. (5)) ist dann so zu verstehen, daß nach Hydrolyse des Galaktosamin-4 bzw. -6-Sulfat-Esters der Schwefelsäurerest infolge der stabileren Ätherbindung am Serin verbleibt.

Einen Verknüpfungsmechanismus sekundärer Art könnten die nach Trypsinspaltung entfernten Hexonbasen repräsentieren, die neben den bereits diskutierten kovalenten Bindungen über Serin und Schwefelsäure noch die Ausbildung heteropolarer Bindungen begünstigen

würden. Weiterhin wären als Verknüpfungsmechanismen sekundärer Art noch zweiwertige Kationen unter besonderer Berücksichtigung der Rolle des Calciums bei der Bildung sogenannter "Übermoleküle" (34) zu nennen.

Das Mißlingen der Präparation von CS-Proteinen aus der Rinderaorta deutet auf eine feste Verankerung der Makromoleküle in der nativen Aortenwand hin, die wäßrige Extraktion nicht zu lösen vermochte, wodurch der Verdacht der Denaturierung der CS-Proteine aus menschlicher Aorta durch unmittelbar postmortal einsetzende Autolysevorgänge - vom Exitus bis zur Obduktion und Konservation verstreicht in den meisten Fällen ein Tag - entsteht. Infolge der größeren Widerstandsfähigkeit und der topographischen Lage dürften Denaturierungsvorgänge im menschlichen Rippenknorpel, wenn auch nicht ganz auszuschließen, so doch auf ein geringes Maß beschränkt bleiben. Folglich können nur die aus Rindernasenknorpel isolierten Präparate als der Nativstruktur sehr nahe kommende CS-Proteine bezeichnet werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch Anwendung spezieller Isolierungsverfahren konnten chromatographisch und in der analytischen Ultrazentrifuge einheitliche Chondroitinsulfat-Proteine aus Rindernasenknorpel, menschlichen Rippenknorpeln verschiedener Altersklassen und menschlicher Aorta dargestellt werden.

2. Die Identifizierung der Polysaccharidkomponente durch Infrarot-Spektrographie und Bestimmung der spezifischen Drehwerte im polarisierten Licht ergaben für die Chondroitinsulfat-Proteine aus Rindernasenknorpel Chondroitinsulfat A, für menschliche Aorta Chondroitinsulfat C. Beim Aufbau der Chondroitinsulfat-Proteine aus menschlichem Rippenknorpel sind sowohl Chondroitinsulfat A und Chondroitinsulfat C beteiligt. Die Anwesenheit von Keratosulfat konnte nicht ausgeschlossen werden.

3. Der Proteinanteil der chromatographisch einheitlichen Chondroitinsulfat-Proteine betrug für menschliche Aorta 21 %, für Rindernasenknorpel 15 %. Für die Chondroitinsulfat-Proteine aus Rippenknorpel wurden altersabhängige Unterschiede im Proteingehalt ermittelt, die zwischen 14 % (40-80 Jahre) und 7 % (Neugeborene) lagen.

   Aminosäureanalysen der Proteinkomponente des Chondroitinsulfat-Proteins aus Rindernasenknorpel schlossen eine Identität oder Verwandtschaft mit Kollagen aus.

4. Molekulargewichtsbestimmungen nach SVEDBERG und FLORY-MANDELKERN sowie aus Lichtstreuungsmessungen ergaben Mol.-Gew. für Chondroitinsulfat-Proteine aus Rindernasenknorpel zwischen 2,7 und 5,5 x 10^5, für menschliche Aorta zwischen

0,71 und 1,5 x 10^5 und für menschlichen Rippenknorpel in altersabhängiger Verteilung zwischen 1,2 und 2,8 x 10^5. Die Mol.-Gew. der Chondroitinsulfat-Proteine aus menschlichem Rippenknorpel nehmen im Laufe des Lebens ab.

5. Cu^{2+}, Ca^{2+} und Co^{2+} bilden mit Chondroitinsulfat-Protein aus Rindernasenknorpel Molekülaggregate mit einem bis auf mehrere Millionen erhöhten Mol.-Gew., wobei die wirksame Calciumkonzentration etwa derjenigen des Nativknorpels entspricht.

6. Der enzymatische Abbau von Chondroitinsulfat-Protein aus Rindernasenknorpel mit Testeshyaluronidase, tryptischen Enzymen und Papain führt zu charakteristischen Veränderungen der chemischen Zusammensetzung, des Aminosäurenspektrums und der Molekülgröße. Die chemische Analyse der Spaltprodukte lieferte Hinweise auf die innermolekulare Struktur des Chondroitinsulfat-Proteins und legt die Funktion des Serins als Brückenaminosäure zwischen Protein- bzw. Peptidanteil und Polysaccharid nahe.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. H. Gibian, Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen
Verlag Franz Deuticke, Wien 1956

2. F. Clark u. J. K. Grant, The Biochemistry of Mucopolysaccharides of Connective Tissue, Biochemical Society
Symposion No. 20. University Press Cambridge 1961

3. G. F. Springer (Ed.), Polysaccharides in Biology, Transactions of the fourth conference 1958, The Josiah Macy, jr. Foundation, New York

4. D. A. Hall, The Chemistry of Connective Tissue
Charles D. Thomas Publisher, Springfield, III. 1961

5. H. G. Elias u. F. Patat, Zur Isolierung und Charakterisierung von Chondroitinschwefelsäuren
Verlag der Wissenschaften und der Literatur in Mainz, in Kommission bei Franz Steiner-Verlag, Wiesbaden 1960

6. M. Stacey u. S. A. Barker, Carbohydrates of Living Tissues, D. van Nostrand Company Ltd., Toronto, London, New York, Princeton, N. J. 1962

7. J. S. Brimacombe u. J. M. Webber, Mucopolysaccharides
Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York 1964

8. R. Kuhn u. H. J. Leppelmann, Liebigs Ann. Chem. 611, 254 (1958)
E. Buddecke u. M. Sziegoleit, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 337, 66 (1964)

9. E. Buddecke, Dtsch. med. Wschr., 86, 1773 (1961)

10. K. Meyer u. J. W. Palmer, J. biol. Chemistry, 107, 629 (1934)

11. H. M. Rauen, Biochemisches Taschenbuch, 2. Auflage, Bd. II, S. 418 ff,
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1964

12. Handbuch der Histochemie, Band II/2, bearbeitet von W. Graumann, Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart 1964

13. C. T. Mörner, Skand. Arch. Physiol. 1, 210 (1889)

14. O. Schmiedeberg, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 28, 355 (1891)

15. J. Shatton u. M. Schubert, J. biol. Chemistry 211, 556 (1954)

16. I. Malawista u. M. Schubert, J. biol. Chemistry 230, 535 (1958)

17. B. R. Gerber, E. C. Franklin u. M. Schubert, J. biol. Chemistry 235, 2870 (1960)

18. B. Johnson u. M. Schubert, J. clin. Invest., 39, 1752 (1960)

19. J. I. Gross, M. B. Mathews u. A. Dorfman, J. biol. Chemistry 235, 2889 (1960)

20. E. Buddecke u. M. Schubert, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie, 325, 189 (1961)

21. M. B. Mathews, Biochim. biophys. Acta (Amsterdam) 58, 92 (1962)

22. M. B. Mathews u. I. Lozaityte, Arch. Bioch. Biophys. 74, 158 (1958)

23. R. V. Webber u. S. T. Bayley, Can. J. Bioch. physiol. 34, 993 (1956)

24. S. M. Partridge, H. F. Davis u. G. S. Adair, Bioch. J. 79, 15 (1961)

25. G. Bernardi, Biochim. biophys. Acta (Amsterdam) 26, 47 (1957)

26. D. Kaplan u. K. Meyer, Nature (London) 183, 1267 (1959)

27. E. Buddecke, W. Kröz u. E. Lanka, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 331, 196 (1963)

28. A. G. Lloyd u. K. S. Dodgson, Nature (London) 184, 548 (1959)

29. M. B. Mathews, Nature (London) 181, 421 (1958)

30. Th. Svedberg u. K. O. Pedersen, Die Ultrazentrifuge Verlag Th. Steinkopf, Dresden-Leipzig 1940

31. L. Mandelkern u. P. Flory, J. Chem. Phys. 20, 212 (1952)

32. M. B. Mathews, Biochim. biophys. Acta (Amsterdam) 37, 288 (1960)

33. E. Buddecke u. R. Drzeniek, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 327, 49 (1962)

34. R. Brönnimann, Das Riesenmolekül Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart 1958

35. Th. Bücher u. D. Mohring in: Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der physiol. u. pathol.-chem. Analyse, Bd. 2, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955

36. H. Muir, Bioch. J. 69, 195 (1959)

37. E. Buddecke, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 318, 33 (1960)

38. A. E. Beet, Nature (London) 175, 514 (1955)

39. W. Schaeg, Dissertation in der math.-naturwissenschaftlichen Fakultät, Gießen 1958

40. W. Schöninger, Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta 869 (1956)

41. N. Boas, J. biol. Chemistry 204, 553 (1953)

42. Z. Dische, J. biol. Chemistry 167, 189 (1947)

43. J. Tillmanns u. K. Philippi, Bioch. Z. 215, 36 (1929)

44. W. Kern u. W. Mehren in: Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der physiol. u. pathol.-chem. Analyse, Bd. 2, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955

45. J. Hengstenberg u. E. Schuch, Makromol. Chemie 7, 236 (1951)

46. U. Schiedt u. H. Reinwein, Z. Naturforschung 7 b, 270 (1952)

47. W. H. Hauss, G. Junge-Hülsing u. F. König Med. Welt 45, 2371 (1962)

48. W.H.Hauss, G.Junge-Hülsing u. F.König, Med.Welt 3, 125 (1963)

49. H.Netter, Theoretische Biochemie Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962

50. B.Vollmert, Grundriß der makromolekularen Chemie Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962

Lebenslauf

Am 14. März 1939 in Eßlingen/N geboren.
Herbst 1946: Besuch der Grundschule in Eßlingen/N.
Herbst 1950: Eintritt in das Georgii-Gymnasium in Eßlingen/N.
Frühjahr 1959: Reifeprüfung am Gymnasium in Nürtingen/N.

Beginn des Studiums der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen zum SS 1959.
Frühjahr 1960: Naturwissenschaftliche Vorprüfung.
Herbst 1961: Ärztliche Vorprüfung.

Beginn einer Dissertation im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Professor Dr. E. Buddecke, die Ende September 1962 experimentell abgeschlossen wurde.

Gleichzeitig Fortsetzung des Medizinstudiums in Tübingen bis einschließlich WS 1962/63. Während SS 1963 und WS 1963/64 Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin. Abschluß des Studiums mit dem medizinischen Staatsexamen im Frühjahr 1965 in Tübingen.

Wolfgang Kröz

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen